(19) 日本国特許庁(JP)　(12) 公表特許公報(A)　(11) 特許出願公表番号
特表2009-527482
(P2009-527482A)
(43) 公表日 平成21年7月30日(2009.7.30)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
A61K 35/34	(2006.01)	A61K	35/34		4B065
A61P 9/00	(2006.01)	A61P	9/00		4C087
A61P 9/10	(2006.01)	A61P	9/10	101	
A61P 9/12	(2006.01)	A61P	9/12		
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00	101	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 153 頁）　最終頁に続く

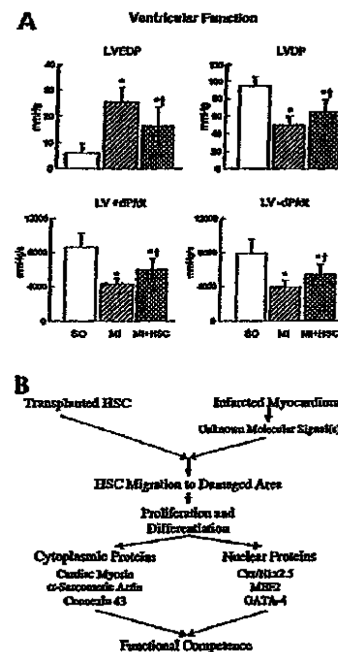
(21) 出願番号　特願2008-555409 (P2008-555409)
(86) (22) 出願日　平成19年2月15日 (2007.2.15)
(85) 翻訳文提出日　平成20年10月8日 (2008.10.8)
(86) 国際出願番号　PCT/US2007/004287
(87) 国際公開番号　WO2007/100530
(87) 国際公開日　平成19年9月7日 (2007.9.7)
(31) 優先権主張番号　11/357,898
(32) 優先日　平成18年2月16日 (2006.2.16)
(33) 優先権主張国　米国 (US)

(71) 出願人　500296804
ニューヨーク　メディカル　カレッジ
NEW YORK MEDICAL COLLEGE
アメリカ合衆国　10595　ニューヨーク州，ヴァルハラ（番地なし）
(74) 代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74) 代理人　100093861
弁理士　大賀　眞司
(74) 代理人　100109346
弁理士　大貫　敏史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】損傷心筋の修復および／または再生の方法および組成物

(57) 【要約】
サイトカイン投与を含む、損傷心筋および／または心筋細胞を修復するための方法、組成物、およびキットを開示および特許請求する。大動脈や大血管の発生のための方法および組成物を開示および特許請求する。本願は、ヒト心臓幹細胞の成長、増殖、および活性化の方法および培地を開示および特許請求する。
【選択図】図４



【特許請求の範囲】
【請求項１】
大冠状血管または動脈を、それが必要な患者において、ｉｎ　ｖｉｖｏ形成するバイテクノロジー方法であって、活性化心臓幹細胞を、血管または動脈が所望される位置に投与することを含む方法。
【請求項２】
活性化心臓幹細胞が下記のステップを含む方法によって入手される請求項１に記載の方法：
ａ．心筋組織を採取し；
ｂ．心臓幹細胞を抽出し；
ｃ．心臓幹細胞を培養および増殖し；
ｄ．心臓幹細胞を１種以上の肝細胞増殖因子および／またはインシュリン様増殖因子－Ｉに暴露する。
【請求項３】
肝細胞増殖因子が約０～４００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項２に記載の方法。
【請求項４】
インシュリン様増殖因子－Ｉが約０～５００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項２に記載の方法。
【請求項５】
活性化心臓幹細胞が自系である請求項１に記載の方法。
【請求項６】
活性化心臓幹細胞がＮＯＧＡカテーテル系を介して送達される請求項１に記載の方法。
【請求項７】
形成された血管または動脈が、閉塞動脈または血管のためのバイパスを提供する請求項１に記載の方法。
【請求項８】
１種以上の増殖因子を含む溶液中で単離心臓幹細胞をインキュベートすることを含む、心臓幹細胞を活性化する方法。
【請求項９】
１種以上の増殖因子が肝細胞増殖因子および／またはインシュリン様増殖因子－Ｉである請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
肝細胞増殖因子が約０～４００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
インシュリン様増殖因子－Ｉが約０～５００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
溶液が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、患者血清、インシュリン、トランスフェリン、および亜セレン酸ナトリウムを含む請求項８に記載の方法。
【請求項１３】
溶液が更に、ヒト組換えｂＦＧＦ、ヒト組換えＥＧＦ、ウリジン、およびイノシンのうち１種以上を含む請求項８に記載の方法。
【請求項１４】
溶液が更に、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および約５～２０％の患者血清、約２～２０μｇ／ｍＬのインシュリン、約２～２０μｇ／ｍＬのトランスフェリン、および約２～１０ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウムを含む請求項８に記載の方法。
【請求項１５】
溶液が更に、約１０～１００ｎｇ／ｍＬのヒト組換えｂＦＧＦ、約１０～１００ｎｇ／ｍＬのヒト組換えＥＧＦ、約０．２４～２．４４ｍｇ／ｍＬのウリジン、および約０．２７～２．６８ｍｇ／ｍＬのイノシンのうち１種以上を含む請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】
溶液が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、０～４００ｎｇ／ｍＬの肝細胞増殖因子、０～５００ｎｇ／ｍＬのインシュリン様増殖因子－Ｉ、５～１０％の患者血清、２０ｎｇ／ｍＬのヒト組換えｂＦＧＦ、２０ｎｇ／ｍＬのヒト組換えＥＧＦ、５μｇ／ｍＬのインシュリン、５μｇ／ｍＬのトランスフェリン、５ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウム、１．２２ｍｇ／ｍＬのウリジン、および１．３４ｍｇ／ｍＬのイノシンを含む請求項８に記載の方法。
【請求項１７】
ＤＭＥＭ／Ｆ１２、患者血清、インシュリン、トランスフェリン、および亜セレン酸ナトリウムを含む、ヒト心臓幹細胞増殖用成長培地。
【請求項１８】
更に、ヒト組換えｂＦＧＦ、ヒト組換えＥＧＦ、ウリジン、およびイノシンのうち１種以上を含む請求項１７に記載の培地。
【請求項１９】
約５～２０％の患者血清、約２～２０μｇ／ｍＬのインシュリン、約２～２０μｇ／ｍＬのトランスフェリン、および約２～１０ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウムと、必要に応じて、約１０～１００ｎｇ／ｍＬのヒト組換えｂＦＧＦ、約１０～１００ｎｇ／ｍＬのヒト組換えＥＧＦ、約０．２４～２．４４ｍｇ／ｍＬのウリジン、および約０．２７～２．６８ｍｇ／ｍＬのイノシンのうち１種以上を含む請求項１７に記載の培地。
【請求項２０】
ＤＭＥＭ／Ｆ１２、５～１０％の患者血清、２０ｎｇ／ｍＬのヒト組換えｂＦＧＦ、２０ｎｇ／ｍＬのヒト組換えＥＧＦ、５μｇ／ｍＬのインシュリン、５μｇ／ｍＬのトランスフェリン、５ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウム、１．２２ｍｇ／ｍＬのウリジン、および約１．３４ｍｇ／ｍＬのイノシンを含む請求項１７に記載の培地。
【請求項２１】
幹細胞を損傷した虚血心筋領域に送達し、心筋を生成または再生する請求項１７に記載の培地。
【請求項２２】
心筋および／または心筋細胞を、それが必要な患者において生成する方法であって、心臓幹細胞を、損傷心筋領域に投与することを含む方法。
【請求項２３】
前記心臓幹細胞が下記のステップを含む方法によって入手される請求項２２に記載の方法：
ａ．心筋組織を採取し；
ｂ．心臓幹細胞を抽出し；
ｃ．心臓幹細胞を培養および増殖する。
【請求項２４】
前記心臓幹細胞が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、患者血清、インシュリン、トランスフェリン、および亜セレン酸ナトリウムを含む成長培地において培養および増殖される請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
培地が更に、ヒト組換えｂＦＧＦ、ヒト組換えＥＧＦ、ウリジン、およびイノシンのうち１種以上を含む請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
培地が、約５～２０％の患者血清、約２～２０μｇ／ｍＬのインシュリン、約２～２０μｇ／ｍＬのトランスフェリン、および約２～１０ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウムと、必要に応じて、約１０～１００ｎｇ／ｍＬのヒト組換えｂＦＧＦ、約１０～１００ｎｇ／ｍＬのヒト組換えＥＧＦ、約０．２４～２．４４ｍｇ／ｍＬのウリジン、および約０．２７～２．６８ｍｇ／ｍＬのイノシンのうち１種以上を含む請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
培地が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、５～１０％の患者血清、２０ｎｇ／ｍＬのヒト組換えｂＦ

ＧＦ、２０ｎｇ／ｍＬのヒト組換えＥＧＦ、５μｇ／ｍＬのインシュリン、５μｇ／ｍＬのトランスフェリン、５ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウム、１．２２ｍｇ／ｍＬのウリジン、および約１．３４ｍｇ／ｍＬのイノシンを含む請求項２４に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願／特許および参照による包含
本出願は、２００２年６月５日付け米国特許出願第１０／１６２７９６号の一部継続であり、前記出願は２００１年７月３１日付け米国特許出願第０９／９１９，７３２号の一部継続であり、前記出願は、２００１年６月６日付け米国特許仮出願第６０／２９５，８０７号、第６０／２９５，８０６号、第６０／２９５，８０５号、第６０／２９５，８０４号、および第６０／２９６，８０３号に対して優先権を主張する。同時継続の２００５年３月１６日付け米国特許出願第１１／０８１８８４号にも言及しておく。
【０００２】
上記出願を含め本明細書で言及される各出願および特許、並びに各出願および特許で言及される各文献または参考文献（各発行済特許の審査経過の過程での「出願引用文献」を含む）や、上記出願および特許に対応するおよび／または優先権主張する各ＰＣＴおよび外国出願または特許、各出願引用文献において引用または参照される各文献は、参照により本明細書に明らかに包含されるものとする。より一般的には、様々な文献または参考文献が本明細書の請求の範囲の前の参考文献リストまたは本文中において引用される。各文献または参考文献（「本明細書引用文献」）および、本文中に引用される全文献（やはり「本明細書引用文献」）、並びに本明細書引用文献中に引用される各文献または参考文献（本明細書および参照により本明細書に包含される文献に記載の製品の製造者仕様書、指示書などを含む）は、参照により本明細書に明らかに包含されるものとする。本明細書に引用される様々な文献が全て本発明の従来技術であるとは認められない。本明細書において発明者に指名された一人以上の者を著者または発明者とする文献は、本明細書における発明に関して他者によらない文献である。また、本明細書引用文献の教示、並びに、本明細書引用文献、より広義には参照により本明細書に包含される全ての文献に引用される文献の教示は、本発明の実用化および有用化に使用され得る。
【０００３】
連邦政府助成研究による発明への権利の陳述
本研究は、国立衛生研究所からの助成金により、政府一部援助によって行われたものである：助成金番号：ＨＬ－３８１３２、ＡＧ－１５７５６、ＨＬ－６５５７７、ＨＬ－５５７５７、ＨＬ－６８０８８、ＨＬ－７０８９７、ＨＬ－７６７９４、ＨＬ－６６９２３、ＨＬ－６５５７３、ＨＬ－０７５４８０、ＡＧ－１７０４２、およびＡＧ－０２３０７１。政府は本発明に所定の権利を有し得る。
【０００４】
発明の分野
本発明は総じて心臓分野に関し、特に、心臓血管系疾患、例えば、但し限定的ではないが、アテローム性動脈硬化、虚血、高血圧、再狭窄、狭心症、リウマチ性心疾患、先天性心血管障害、動脈炎症、その他の動脈、細動脈、毛細血管疾患などを罹患する患者を処置する方法および細胞組成物に関する。本発明は、心臓または血管バイパス手術といった従来の侵襲的な治療処置の代わりに、またはそれと合わせて使用し得る、処置、治療、および方法を意図する。
【０００５】
更に、本発明は下記の一つ以上に関わる：
治療有効量の体細胞性幹細胞を、単独で、または、サイトカイン、例えば幹細胞因子（ＳＣＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、間質細胞由来因子－１、ｓｔｅｅｌ　ｆａｃｔｏｒ、血管内皮増殖因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ刺激因子、もしくはイ

ンターロイキン－３、または幹細胞を刺激および／もしくは可動化し得る任意のサイトカインからなる群から選択されるサイトカインと組合せて含む方法および／または医薬組成物。サイトカインは、単独で、または、幹細胞の刺激および／または可動化；早期または後期造血の維持（下記参照）；単球の活性化（下記参照）、マクロファージ／単球増殖；分化、運動性、生存（下記参照）において能力を発揮する任意の他のサイトカイン、並びに薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤（これらの組合せを含む）と組合せて投与することができる。幹細胞は、成人幹細胞、例えば造血幹細胞もしくは心臓幹細胞もしくはこれらの組合せ、または心臓幹細胞と任意の別種の幹細胞の組合せが有利である。

【０００６】

幹細胞、例えば成人幹細胞、具体的には造血幹細胞もしくは心臓幹細胞もしくはこれらの組合せ、または心臓幹細胞（例えば成人心臓幹細胞）と別種の幹細胞種（例えば別種の成人幹細胞）の任意の組合せの、単独での、または、サイトカイン、例えば幹細胞因子（ＳＣＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM－ＣＳＦ）、間質細胞由来因子－１、ｓｔｅｅｌ　ｆａｃｔｏｒ、血管内皮増殖因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ刺激因子、もしくはインターロイキン－３、または幹細胞を刺激および／または可動化し得る任意のサイトカインからなる群から選択されるサイトカインと一緒の、循環組織または筋肉組織または循環筋肉組織、例えば心臓または血管（具体的には心臓に出入りする静脈、動脈、より具体的には心臓に直接接続または付随または流入する静脈および動脈、例えば大動脈）などの心臓組織への、移植(implanting)、沈着(depositing)、もしくは投与、または移植、沈着、もしくは投与の惹起（ここで「サイトカインと一緒の．．．」とは、幹細胞とサイトカインの逐次的な移植、沈着、もしくは投与、または逐次的な移植、沈着、もしくは投与の惹起、或いは、幹細胞とサイトカインの共移植、共沈着、もしくは共投与、または共移植、共沈着、共投与の惹起、或いは同時移植、同時沈着、もしくは同時投与、または同時移植、同時沈着、同時投与の惹起を含み得る）。上記移植、沈着、もしくは投与、または移植、沈着、もしくは投与の惹起は、グラフト(graft)を伴い得る。そのような移植、沈着、もしくは投与、または移植、沈着、もしくは投与の惹起は、心臓の衰弱部位または瘢痕部位を治療したり、そのような部位の発生または再発生を防止したり、そのような部位を惹起もしくは刺激する症状、例えば心筋梗塞、虚血、その他、例えば心臓に衰弱や瘢痕をもたらす遺伝性疾患の処置など、心臓疾患の処置または治療または予防に有利に使用される（後述する心臓疾患も参照）。

【０００７】

かかる処置、治療、または予防のための薬剤の処方における、かかる幹細胞の単独または前記サイトカインと組合せた使用。

幹細胞と必要に応じてサイトカインを含む、かかる処置、治療、または予防に使用される薬剤。

かかる処置、治療、または予防に使用される、処方用の幹細胞および必要に応じてサイトカインを含むキット。

幹細胞と必要に応じて少なくとも１種のサイトカインを含む組成物と、かかる組成物を調製するためのキット。

上記キットおよび組成物を製造する方法。

幹細胞を移植もしくは沈着する、または幹細胞の移植もしくは沈着を惹起する方法。

【０００８】

循環組織または筋肉組織または循環筋肉組織、例えば心臓または血管（具体的には心臓に出入りする静脈、動脈、より具体的には心臓に直接接続または付随または流入する静脈および動脈、例えば大動脈）などの心臓組織への、心臓幹細胞または心臓原始細胞の移動および／または増殖を惹起させるための治療有効量の１種以上のサイトカインを含む方法および／または医薬組成物。上記移動および／または増殖は、心臓の衰弱部位または瘢痕部位を治療したり、そのような部位の発生または再発生を防止したり、そのような部位を惹起もしくは刺激する症状、例えば心筋梗塞、虚血、その他、例えば心臓に衰弱や瘢痕を

もたらす遺伝性疾患の処置など、心臓疾患の処置または治療または予防に有利に使用される（後述する心臓疾患も参照）。

【０００９】

２種以上のサイトカインを含む、かかる処置、治療、または予防に使用される薬剤。

かかる処置、治療、または予防に使用される、処方用サイトカインを含むキット。

上記サイトカインを含む組成物およびかかる組成物を調製するためのキット。

上記キットおよび組成物を製造する方法。

【００１０】

高血圧、心筋梗塞、虚血、アンギナ、その他の冠状動脈疾患または血管性疾患の治療に有効な、治療有効量の薬剤、例えばＡＴ$_1$レセプター遮断剤、具体的にはロサルタン、ストレプトキナーゼ、ＲｅｏＰｒｏ（ａｂｃｉｘｉｍａｂ）、マレイン酸エナラプリル、Ｒａｐｉｌｙｓｉｎ（ｒｅｔｅｐｌａｓｅ）、Ｄｉｌａｔｒｅｎｄ（ｃａｒｖｅｄｉｌｏｌ）、Ａｃｔｉｖａｓｅ（ａｌｔｅｐｌａｓｅ）、その他当業者には周知の類似用途の薬剤と組合せた、循環組織または筋肉組織または循環筋肉組織、例えば心臓または血管（具体的には心臓に出入りする静脈、動脈、より具体的には心臓に直接接続または付随または流入する静脈および動脈、例えば大動脈）などの心臓組織への、心臓幹細胞または心臓原始細胞の移動および／または増殖を惹起させるための治療有効量の１種以上のサイトカインを含む方法および／または医薬組成物。

【００１１】

上記医薬組成物を用いた、高血圧、心筋梗塞、虚血、アンギナ、その他の冠状動脈疾患または血管性疾患の患者の処置方法。

高血圧、心筋梗塞、虚血、アンギナ、その他の冠状動脈疾患または血管性疾患を治療する上で有効な薬剤と組合せて１種以上のサイトカインを含むキット。

上記キットおよび組成物の製造方法および使用方法。

幹細胞、特に心臓幹細胞を単離、増殖、活性化する方法。

幹細胞、特に心臓幹細胞の培養、増殖、および／または活性化に使用される培地。

必要に応じて１種以上のサイトカインの存在下に、幹細胞、特に心臓幹細胞、とりわけ活性化心臓幹細胞を投与することを含む、動脈および／または血管の閉塞(occusion、blockage)を治療する方法。

【背景技術】

【００１２】

発明の背景

心血管疾患は先進工業国全体を通して主要な健康リスクである。最もよく見られる心血管疾患であるアテローム性動脈硬化は、心臓麻痺、卒中、四肢の壊疽の主因であって、米国で主要な死因である。アテローム性動脈硬化は、多くの細胞種と分子要因が関与する複雑な疾患である（詳細は、Ｒｏｓｓ，１９９３，Ｎａｔｕｒｅ　３６２：８０１－８０９を参照）。

【００１３】

虚血は、不十分な潅流によって臓器組織内の酸素供給が不足することを特徴とする状態である。不十分な潅流には多数の自然発生的な要因があり、幾つか例を挙げると、アテローム性または狭窄性病変、貧血、または脳溢血などが該当する。バイパス手術中の血流の遮断など、多くの医療的介入も虚血をもたらす。罹患した心血管組織によって惹起される場合に加え、虚血性心臓疾患のように、虚血が心血管組織に影響する場合もある。但し、虚血は、酸素供給が不足したどの臓器にも起こり得る。

【００１４】

心臓虚血の最も一般的な原因は、心臓発作として一般に知られる心筋梗塞（ＭＩ）であり、最もよく知られた心血管疾患の一つである。１９９８年の推計では、米国内で７３０万人がＭＩを患っており、毎年百万人以上がＭＩを経験する（米心臓病協会，２０００年）。このうち、２５％の男性および３９％の女性が、最初にＭＩに気付いてから１年以内に死亡している（米心臓病協会，２０００年）。ＭＩは、血流が心臓の一部へ急激にしか

も長時間届かなくなることにより起こり、一般に冠状動脈の狭窄によって生じる。適当な血液供給がなければ、組織は虚血性になり、筋細胞や血管構造体の死をもたらす。この部分の壊死組織は梗塞部位と呼ばれており、最終的に瘢痕組織となる。生存は梗塞部位の大きさに左右され、梗塞サイズが増大すれば回復の可能性は小さくなる。例えば、ヒトでは、左心室の４６％以上の梗塞は、不可逆性の心原性ショックおよび死亡の引き金となる（９９）。

【００１５】

現在のＭＩ治療は再潅流療法に重点が置かれており、これは患部への血流を開始して更なる組織損失を防ぐことを試みる。再潅流療法の主要選択肢として、抗血栓溶解剤の使用、バルーン血管形成、冠状動脈パイパスグラフトなどがある。抗血栓溶解剤は、動脈を閉塞し得る血栓を溶解し、バルーン血管形成は動脈を通してカテーテルを閉塞部位に挿入し、そこでカテーテルの先端を膨張させ、動脈を押し広げる。より侵襲的な方法としてバイパスがある。それは、外科医が患者の動脈の一部を取出し、それを使って心臓内に新たな動脈を作り、閉塞をパイバスして患部への血液供給を継続させるものである。１９９８年には、推計５５万３千件の冠状動脈パイパス移植手術および５３万９千件の経皮経管冠状動脈形成手術が行われた。これらの手術はそれぞれ患者当たり平均２７，０９１米ドルおよび８，９８２米ドルの費用がかかる（米心臓病協会，２０００年）。

【００１６】

上記処置によって血液供給を再確立することはできるかもしれないが、再潅流処置を始める前に起こった組織損傷は不可逆的であると考えられている。このため、処置が可能なＭＩ患者には、梗塞部位を制限するために出来るだけ早く再潅流処置が開始される。

【００１７】

当然ながら、大半のＭＩ研究は梗塞サイズを縮小することに重点を置いている。心筋細胞または骨格筋芽細胞を移植することにより壊死組織を再生しようする試みも幾つかある（Ｌｅｏｒ ｅｔ ａｌ．，１９９６；Ｍｕｒｒａｙ，ｅｔ ａｌ．，１９９６；Ｔａｙｌｏｒ，ｅｔ ａｌ．，１９９８；Ｔｏｍｉｔａ ｅｔ ａｌ．，１９９９；Ｍｅｎａｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．，２０００）。移植後、細胞は生存するかもしれないが、機能的にも構造的にも正常な健康心筋および冠状血管を再構成することはできない。

【００１８】

正常な成人における全ての細胞は体内の種々の部位に存在する前駆細胞として発生する。これらの細胞は、始原細胞と呼ばれる極めて未熟な細胞に由来する。始原細胞は、メチルセルロースまたは寒天などの半固体培地において１～３週間培養して細胞の近接コロニーを発生させることによりアッセイされる。始原細胞自体は、幹細胞と呼ばれる一群の始原細胞に由来する。幹細胞は、分裂に当たり、自己再生および始原細胞への分化の両方の能力を持つ。即ち、幹細胞が分裂すると、別の原始幹細胞と、幾らか分化が進んだ始原細胞とが生成される。血液細胞の発生における幹細胞の周知の役割に加え、幹細胞は、限定的ではないが、肝、脳、心臓を含む他の組織に見られる細胞も生じる。

【００１９】

幹細胞は無限に分裂し、特定の細胞種に特殊化する能力を持つ。卵が受精して分割を開始した後に存在する全能幹細胞は全ての可能性を持ち、いかなる種類の細胞にもなり得る。細胞が胞胚期に達すると、細胞の可能性は低下するものの、細胞は依然として体内のいかなる細胞にも進化し得る。但し、胚の発達に必要な支援組織には成長し得ない。細胞は、依然として多数の細胞種に進化し得るので、多能性(pluripotent)であると見なされる。進化の間、細胞はより特殊化され、特定の機能を持つ細胞を生じることになる。多能性(multipotent)と見なされる細胞はヒト成人に認められ、成人幹細胞と称される。幹細胞は骨髄に存在すること、および血流中を循環する少量の末梢血幹細胞があることが周知である（国立衛生研究所，２０００年）。

【００２０】

その再生性により、幹細胞は、組織および臓器設計の可能性の未開発資源と考えられている。心臓疾患に対処する上で、幹細胞の利用法を提供することは有利である。

【００２１】
下記に文献を列挙する：
視覚回復療法として使用され得る、網膜幹細胞の網膜細胞へのｉｎ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｔｒｏ分化に関する米国特許第６，１１７，６７５号。
ランゲルハンス幹細胞島から機能性島への発達に関わる米国特許第６，００１，９３４号。
軟骨組織修復のための間葉幹細胞の使用、および靱帯の再生のための間葉幹細胞の使用に関わる米国特許第５，９０６，９３４号および第６，１７４，３３３号。例えば、ここでは、幹細胞をゲル基質に包埋し、それを収縮させ、移植して、所望の軟組織を置換する。
細胞移植(cell transplantation)を伴うグラフトに関わる米国特許第６，０９９，８３２号および第６，１１０，４５９号。
自己骨髄および間葉幹細胞の心筋内注入に関わるＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ００／０８３５３号（ＷＯ００／５７９２２）およびＰＣＴ／ＵＳ９９／１７３２６号（ＷＯ００／０６７０１）。これらの特許は本発明のような造血幹細胞（特に本発明の造血細胞は有利には単離および／または精製された成人造血幹細胞である）の投与、移植、沈着、または使用を教示も示唆もしていない。
【００２２】
更に、少なくとも所定の上記特許文献は、別の理由で本発明を教示も示唆もしていない。問題の幹細胞源は、再生が要求される細胞種の周知の前駆体に限定される。所与の組織中には極めて少数の幹細胞しか存在しないので、かかる特定の細胞を入手・精製することは極めて困難である。これに対して、本発明の利点は、種々の幹細胞系統が、心筋損傷にホーミングし、適当な細胞種に分化する能力を持つことから得られる。該方法では、幹細胞が心筋から直接回収される必要がなく、再生組織の機能性を危うくすることなく様々な幹細胞種を使用し得る。上記特許文献の他のものでは、幹細胞を種々の化学組成物の資源として使用しており、それらの増殖能力は利用されておらず、本発明を教示または示唆するものではない。
【００２３】
最近の文献で、周知の特殊化の他に組織の修復を助成する幹細胞の可能性が調査し始められている。幹細胞の柔軟性、即ち胚葉の境界線を横切る能力は初期段階のみの概念である（Ｋｅｍｐｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，２０００、Ｔｅｍｐｌｅ，２００１）。Ｋｏｃｈｅｒら（２００１年）は、左心室再構築の代替療法として梗塞後の新血管新生を誘導するための成人骨髄の使用を検討している（Ｒｏｓｅｎｔｈａｌ ａｎｄ Ｔｓａｏ，２００１で再検討）。他の研究では、特定の幹細胞種、即ちＭａｌｏｕｒら（２００１年）に見られるような肝幹細胞を、誘導して心筋細胞に分化させている。更に別の研究では、骨髄由来幹細胞の可能性に注目している（Ｋｒａｕｓｅ，ｅｔ ａｌ．，２００１）。
【００２４】
医学における幹細胞の最古の利用例の一つは、癌治療である。かかる療法においては、自身の骨髄が放射線によって破壊された患者に骨髄を移植し、移植骨髄中の幹細胞に、新しい健康な白血球を生成させる。
【００２５】
上記療法においては、正常な環境に移植することで、幹細胞は正常な機能を継続する。最近まで、任意の特性の幹細胞は、３種か４種の細胞しか生成できないと考えられており、従って、幹細胞は、その能力が証明されている細胞種の１つになることが要求される治療にのみ利用されていた。研究者らは、幹細胞の役割が十分に定義されていない多数の障害の治療に対してその他の選択肢を探索し始めている。そのような研究の例は本発明の裏付けとして呈示される。
【００２６】
臓器移植は、罹患し機能性を失った組織を置換するために広範に利用されている。より最近では、宿主組織機能の欠乏を増補するための細胞移植が潜在的な治療例として出現し

ている。この方法の一例として、パーキンソン症の患者における胎生組織の利用が有名であり（Ｔｏｍｐｓｏｎ，１９９２において再検討）、移植細胞からのドーパミン分泌が患者の不全を緩和する。その他の研究では、罹患していない兄弟姉妹由来の移植筋芽細胞をデュシェンヌ患者の内因生筋管に融合する。重要なことは、移植筋管が野生型ジストロフィンを発現したことである（Ｇｕｓｓｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９２）。

【００２７】

他領域における関連性にも関わらず、上記の早期研究では、損傷心筋を置換できることが明らかな臨床的関連性を持つ心臓にうまく適用される細胞移植技術は報告されていない。更に、血管由来因子およびイオンチャネル型ペプチドの長期発現を目的とする心内グラフトの利用は、それぞれ心筋虚血または鬱血性心不全の個体において治療的価値があろう。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００２８】

上記背景を踏まえ、心臓における心筋再生技術の向上が必要とされる。かかる技術は、心臓における組織再生をもたらすのみならず、有効成分を心臓に直接送達し得ることが望ましい。本発明はこのような必要性に取り組む。

【００２９】

従って、本開示および本発明における、幹細胞の、単独のまたは少なくとも１種のサイトカインと組合せた、沈着、移植、もしくは投与を惹起する投与、移植、もしくは沈着、並びに、かかる幹細胞の、単独のまたは上記のごときサイトカインと組合せた、処置、治療、または予防のための医薬処方における使用は、当分野において開示または示唆されておらず、本明細書における方法、組成物、キット、および使用は新規であり、非自明であり、発明性があり、即ち、本発明は当分野において教示または示唆されておらず、本発明は新規であり、非自明であり、発明性があると考えられる。

【課題を解決するための手段】

【００３０】

発明の目的と概要

驚くべきことに、心筋梗塞のあとに梗塞の周囲の心筋に体細胞性幹細胞を移植すると、損傷領域に移動し、筋細胞、内皮細胞および平滑筋細胞に分化し、次いで増殖し、心筋、冠状動脈、細動脈および毛細血管を含む構造体を形成し、梗塞の構造的および機能的完全性を回復することが見出された。

【００３１】

更に驚くべきことに、心筋梗塞のあと、サイトカインを患者に投与すると、患者の常在および／または循環幹細胞を刺激し、それらを血流に入れ、梗塞領域にホーミングさせることが見出された。一旦細胞が梗塞にホーミングすると、損傷組織に移動し、筋細胞、内皮細胞および平滑筋細胞に分化し、次いで増殖し、心筋、冠状動脈、細動脈および毛細血管を含む構造体を形成し、梗塞領域の構造的および機能的完全性を回復することも見出された。

【００３２】

驚くべきことに、常在心臓幹細胞（ＣＳＣ）はヒト心臓（８２）およびラット心臓（８３，８４）において最近同定された。これら原始細胞は心房に蓄積する傾向にあるが（８２）、心室筋全体にも存在する（８２，８３，８４）。ＣＳＣは、造血および骨格筋幹細胞に一般に見られる表面抗原を発現する（８５，８６）。ＣＳＣはクローン原性であり、自己再生性であり、全ての心臓系を生じる多能性である（８４）。ＣＳＣの成長特性の故に、損傷した心臓は自己修復する可能性を持つ。しかしながら、この可能性は、新しく組織された機能性心筋内でのＣＳＣのコロニー形成、増殖、および分化を我々が理解していないことにより制限されている（６１，８７）。同一の障害が生物体におけるその他の幹細胞源にも当てはまる（８８）。

【００３３】

造血幹細胞および肝幹細胞において（８９，９０，９１）、最も重要には星状骨格筋細胞において（９２）ｃ－Ｍｅｔが同定されたことで、そのリガンドである肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）がＣＳＣに生物学的作用を及ぼすかの判定が促された。ＨＧＦがＣＳＣを可動化し、解剖学的貯蔵域から梗塞直後の損傷部位へ移行させると仮定する。ＨＧＦは、マトリックスメタロプロテイナーゼ－２の発現および活性化を通して（９４，９５）細胞移動に積極的に影響する（９３）。この酵素ファミリーは、細胞外マトリックス中の障壁を破壊し、ＣＳＣ移動、ホーミング、および組織回復を容易にする。

【００３４】

同様に、インシュリン様増殖因子－１（ＩＧＦ－１）は有糸分裂誘発性、抗アポトーシス性であり、神経幹細胞の増殖および分化に必要とされる（９６，９７，９８）。同様に、その数を増やしたり生存可能性を保護することにより、ＩＧＦ－１はＣＳＣに影響する。ＩＧＦ－１過剰発現は、成体マウス心臓において筋細胞増殖を特徴とするが（６５）、この細胞成長はＣＳＣ活性化、分化、および生存に依存し得る。

【００３５】

その結果、本発明は、循環組織または筋肉組織または循環筋肉組織への心臓幹細胞または心臓原始細胞の移動および／または増殖を惹起するために有効量の１種以上のサイトカイン、例えばＨＧＦおよびＩＧＦ－１の投与を含む、損傷後まもなくの心筋および／または心筋細胞を修復および／または再生するための方法および／または組成物を提供する。この移動／および増殖は、心臓の衰弱部位または瘢痕部位を処置したり、そのような部位の発生または再発生を防止したり、そのような部位を惹起もしくは刺激する症状、例えば心筋梗塞、虚血、その他、例えば心臓に衰弱または瘢痕をもたらす遺伝性疾患の処置など、心臓疾患の処置または治療または予防に有利に使用される。

【００３６】

ここで使用されるプロトコルは、壊死または瘢痕化した心筋を、心筋細胞（４２，７９）、骨格筋芽細胞（５５，７６）、または将来使用が見込まれる胎児細胞（１００，１０１）の移植により置換するのに用いられる方法よりも優れていることを示唆しておくのは妥当である。これらの試みは移植細胞の多くをうまく生存させているが、心室壁の残存部分に構造的および機能的に統合された健康な心筋および冠状血管を再構成できない。ＣＳＣは、心臓の正常細胞ターンオーバーを調節するようプログラムされており、ストレスの多い状態では、損傷心室の回復に構造的および機械的に関与する。（８２，１０２）。

【００３７】

本発明は更に、循環組織または筋肉組織または循環筋肉組織への心臓幹細胞または心臓原始細胞の移動および／または増殖を惹起するための、治療有効量の１種以上のサイトカインを含む方法および／または組成物を提供する。この移動／および増殖は、心臓の衰弱部位または瘢痕部位を処置したり、そのような部位の発生または再発生を防止したり、そのような部位を惹起もしくは刺激する症状、例えば心筋梗塞、虚血、その他、例えば心臓に衰弱または瘢痕をもたらす遺伝性疾患の処置など、心臓疾患の処置または治療または予防に有利に使用される。

【００３８】

本発明は更に、かかる処置、治療、または予防に使用するための薬剤を提供する。

本発明は更に、かかる処置、治療、または予防に使用するための処方用の、１種以上のサイトカインを含むキットを提供する。

本発明は更に、上記キットおよび組成物を製造する方法を提供する。

本発明は更に、１種以上のサイトカインを、心臓疾患または血管性疾患を処置するための治療剤と組合せて含む、かかる処置、治療、または予防に使用するための組成物および／またはキットを提供する。

【００３９】

本発明は、体細胞性幹細胞、例えば成人幹細胞または心臓幹細胞または造血幹細胞またはこれらの組合せ、例えば成人心臓幹細胞または成人造血幹細胞またはこれらの組合せ、または心臓幹細胞と別種の幹細胞の組合せ、例えば成人心臓幹細胞と別種の成人幹細胞の

組合せを投与することを含む、損傷後まもない心筋および／または心筋細胞を修復および／または再生するための方法および／または組成物を提供する。

【００４０】

１つの態様においては、本発明は、幹細胞投与に先立つ、幹細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養および／または増殖に使用される培地を提供する。

本発明は更に、少なくとも１種のサイトカインの投与を含む、損傷後まもない心筋および／または心筋細胞を修復および／または再生するための方法および／または組成物を提供する。

【００４１】

本発明は更に、心臓疾患または血管性疾患の処置に有効な薬剤と組合せて１種以上のサイトカインを投与することを含む、損傷後まもない心筋および／または心筋細胞を修復および／または再生するための方法および／または組成物を提供する。

本発明は更に、体細胞性幹細胞、例えば成人幹細胞または心臓幹細胞または造血幹細胞またはこれらの組合せ、例えば成人心臓幹細胞または成人造血幹細胞またはこれらの組合せ、または心臓幹細胞と別種の幹細胞の組合せ、例えば成人心臓幹細胞と別種の成人幹細胞の組合せ、並びにサイトカインを投与することを含む、損傷後まもない心筋を修復および／または再生するための方法および／または組成物を提供する。

【００４２】

本発明は更に、薬学的に許容される担体と体細胞性幹細胞および／またはサイトカンを混合することを含む、上記のまたは本開示の組成物のいずれかを調製する方法を提供する。

本発明は更に、損傷後まもない心筋および／または心筋細胞を修復および／または再生するのに使用される医薬組成物を含むキットを提供する。

【００４３】

本発明は、幹細胞、例えば成人幹細胞、具体的には造血幹細胞または心臓幹細胞またはこれらの組合せ、または心臓幹細胞（例えば成人心臓幹細胞）と別種の幹細胞（例えば別種の成人幹細胞）の任意の組合せの、単独での、または、サイトカイン、例えば幹細胞因子（ＳＣＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、間質細胞由来因子－１、ｓｔｅｅｌ　ｆａｃｔｏｒ、血管内皮増殖因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ刺激因子、もしくはインターロイキン－３、または幹細胞を刺激および／または可動化し得る任意のサイトカインからなる群から選択されるサイトカインと一緒に、循環組織または筋肉組織または循環筋肉組織、例えば心臓または血管（具体的には心臓に出入りする静脈、動脈、より具体的には心臓に直接接続または付随または流入する静脈および動脈、例えば大動脈）などの心臓組織への、移植、沈着、もしくは投与、または移植、沈着、もしくは投与の惹起を含む方法を提供する（ここで「サイトカインと一緒に．．．」とは、幹細胞とサイトカインの逐次的な移植、沈着、もしくは投与、または逐次的な移植、沈着、もしくは投与の惹起、或いは、幹細胞とサイトカインの共移植、共沈着、もしくは共投与、または共移植もしくは共沈着もしくは共投与の惹起、或いは同時移植、同時沈着、もしくは同時投与、または同時移植もしくは同時沈着もしくは同時投与の惹起を含み得る）。上記移植、沈着、もしくは投与、または移植、沈着、もしくは投与の惹起はグラフトを伴い得る。

【００４４】

そのような移植、沈着、もしくは投与、または移植、沈着、もしくは投与の惹起は、心臓の衰弱部位または瘢痕部位を処置したり、そのような部位の発生または再発生を防止したり、そのような部位を惹起もしくは刺激する症状、例えば心筋梗塞、虚血、その他、例えば心臓に衰弱または瘢痕をもたらす遺伝性疾患の処置など、心臓疾患の処置または治療または予防に有利に使用される。（後述する心臓疾患も参照）。

【００４５】

本発明は更に、かかる幹細胞の、単独での、または、前記サイトカインと組合せた、かかる処置、治療、または予防のための薬剤の処方における使用を提供する。

故に、本発明は、幹細胞および必要に応じてサイトカインを含む、かかる処置、治療、または予防に使用される薬剤を提供する。

【００４６】

同様に本発明は、かかる処置、治療、または予防に使用される、処方用の幹細胞および必要に応じてサイトカインを含むキットを提供する。幹細胞およびサイトカンはパッケージ内の別個の容器、またはパッケージ内の１つの容器に入れられる。キットは、必要に応じて、投与デバイス（例えば注射器）並びに／または投与および／もしくは混合のための取扱説明書を含む。

【００４７】

本発明は更に、かかる幹細胞と必要に応じてサイトカインを含む組成物、かかる組成物を調製するためのキット（例えば、幹細胞と必要に応じてサイトカンを含むキット。幹細胞とサイトカインはパッケージ内の別個の容器、またはパッケージ内の１つの容器に入れられる。キットは、必要に応じて、投与デバイス（例えば注射器）並びに／または投与および／もしくは混合のための取扱説明書を含んでもよい）、および上記組成物を製造する方法を提供する。

【００４８】

本発明は、体細胞性幹細胞および心臓組織を必要によってはサイトカインの存在下でｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養する、心筋をｅｘ　ｖｉｖｏ生成および／または再生する手段を提供する。体細胞性幹細胞は筋細胞、平滑筋細胞および内皮細胞に分化し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖し、心筋組織および／または細胞を形成する。かかる組織および細胞は、動脈、細動脈、毛細血管および心筋などの心臓構造体に集成する。構造的および機能的完全性を回復するために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで形成された組織および／または細胞を患者に、例えばグラフトで移植し得る。

【００４９】

本発明は更に、動脈または血管の閉塞の治療に有効な大血管を生成する手段を提供する。かかる方法は、従来の心臓バイパス手術の代替としてまたは併用法として有効である。本発明の方法は心臓幹細胞の単離、増殖、および活性化に関し、１種以上の幹細胞と接触させることで心臓幹細胞が活性化する。活性化された心臓幹細胞を閉塞部位に送達または移植する。

【００５０】

更に、本発明は、幹細胞、特に心臓幹細胞の培養および増殖に使用し得る成長培地を提供する。また、幹細胞、特に心臓幹細胞を活性化するのに使用し得る成長培地も提供される。前記培地で成長させた非活性化幹細胞を投与して、心筋または脈管系を再生することができる。培地で成長させた活性化幹細胞を投与して、心筋または脈管系を再生することもでき、この場合は、脈管系は例えば生体バイパスにおける大動脈および静脈を含む。

【００５１】

本開示において、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ，ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」などは米国特許法においてそれらに与えられた意味を有し、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ，ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」などを意味する。「実質的に構成される（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ，　ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ）」も同様に米国特許法に記載された意味を有し、用語はオープンエンドであり、記載されたものの基本的または新規の特性が記載されたもの以上の存在によって変更されない限り記載されたもの以上の存在を許容し、ただし従来技術の実施態様を除外する。

【００５２】

本発明の方法は、医療行為に対する侵害例外はバイオ関連特許を侵害するプロセスの実務に適用されないと規定する米国特許法第２８７条（ｃ）（２）（Ａ）（ｉｉｉ）に従うバイオテクノロジー方法と見なされる。

これらおよびその他の実施態様が以下の詳細な説明に開示され、明らかとなり、包含される。

【００５３】
本発明を例を挙げて説明するために与えられるが、記載の特定の実施形態に本発明を限定することのない以下の詳細な説明は、参照によって本明細書に包含される添付の図面と併せて理解されよう。
【発明を実施するための最良の形態】
【００５４】
詳細な説明
本発明は、治療有効量の体細胞性幹細胞を、単独で、または、サイトカイン、例えば幹細胞因子（ＳＣＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、間質細胞由来因子－１、ｓｔｅｅｌ　ｆａｃｔｏｒ、血管内皮増殖因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ刺激因子、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、インシュリン様増殖因子（ＩＧＦ－１）、もしくはインターロイキン－３、または幹細胞を刺激および／もしくは可動化し得る任意のサイトカインからなる群から選択されるサイトカインと組合せて含む方法および／または医薬組成物を提供する。サイトカインは、単独で、または、幹細胞の刺激および／または可動化；早期または後期造血の維持（下記参照）；単球の活性化（下記参照）、マクロファージ／単球増殖；分化、運動性、生存（下記参照）；心臓疾患または血管性疾患の処置において能力を発揮する任意の他のサイトカインまたは薬剤、並びに薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤（これらの組合せを含む）と組合せてまたは一緒に投与することができる。
【００５５】
本発明は更に、循環組織または筋肉組織または循環筋肉組織、例えば心臓または血管（具体的には心臓に出入りする静脈、動脈、より具体的には心臓に直接接続または付随または流入する静脈および動脈、例えば大動脈）などの心臓組織への、心臓幹細胞または心臓原始細胞の移動および／または増殖を惹起させるための治療有効量の１種以上のサイトカインを含む方法および／または医薬組成物を提供する。
【００５６】
好ましい態様においては、方法および／または組成物（医薬組成物を包含する）は、有効量の２種以上のサイトカインを含む。特に、該方法および／または組成物は、有効量の肝細胞増殖因子およびインシュリン様増殖因子－１を含むのが好ましい。
【００５７】
本発明の医薬組成物中のサイトカインとしては、早期および後期造血の維持に関わることが周知のメディエータ、例えばＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３；コロニー刺激因子、トロンボポエチン、エリスロポエチン、幹細胞因子、ｆｉｔ－３リガンド、肝細胞増殖因子、腫瘍壊死因子α、白血病阻害因子、形質転換増殖因子β１およびβ３；マクロファージ炎症プロテイン１α）、血管原性因子（線維芽細胞増殖因子１および２、血管内皮増殖因子）、および、結合組織形成細胞を通常標的（および資源）とするメディエータ（血小板由来増殖因子Ａ、表皮増殖因子、形質転換増殖因子αおよびβ２、オンコスタチンＭ、およびインシュリン様増殖因子－１）、または神経細胞（神経成長因子）（Ｓｅｎｓｅｂｅ，Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ　１９９７；１５；１３３－４３）、血小板および巨核細胞中に存在するＶＥＧＦポリペプチド（Ｗａｒｔｉｏｖａａｒａ，Ｕ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｒｏｍｂ　Ｈａｅｍｏｓｔ　１９９８；８０：１７１－５；Ｍｏｈｌｅ，Ｒ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１９９７；９４：６６３－８）ＨＩＦ－１、低酸素症に対する応答に関与する数種の遺伝子のプロモータに結合して刺激する強力な転写因子、内皮ＰＡＳドメインプロテイン１（ＥＰＡＳ１）、単球走化性プロテイン－１（ＭＣＰ－１）といった付随機能を増進するための単球由来サイトカインなどが挙げられる。
【００５８】
別の好ましい態様においては、方法および／または組成物（医薬組成物を包含する）は、有効量の２種以上のサイトカインを、心臓疾患および／または血管性疾患を処置する上で有効な適当な薬剤と組合せて含む。

【００５９】
好ましい一態様においては、本発明の医薬組成物は注射によって送達される。投与（送達）経路としては、限定的ではないが、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、心筋内、経心内膜、経心外膜、鼻腔内投与などの皮下または非経口投与、髄腔内および輸液法が挙げられる。従って、医薬組成物は注射に適した形態であるのが好ましい。

【００６０】
本発明の治療薬を非経口投与するに場合、通常は、単位用量の注射可能な形態で処方される（溶液、懸濁液、エマルジョン）。注射に適した医薬製剤としては、無菌水溶液もしくは分散液、または注射可能な無菌水溶液もしくは分散液に再構成される無菌粉末が挙げられる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、これらの適当な混合物、および植物油を含む溶剤または分散媒体であり得る。

【００６１】
例えば、レシチンのようなコーティングを使用すること、分散液の場合には必要な粒径を維持すること、および界面活性剤を使用することによって、適当な流動性を維持し得る。綿実油、ごま油、オリーブ油、大豆油、コーン油、ヒマワリ油、ピーナッツ油、および、ミリスチン酸イソプロピルのようなエステルなどの非水性ビヒクルを、化合物組成物の溶剤系として使用し得る。

【００６２】
更に、抗菌保存剤、抗酸化剤、キレート化剤、および緩衝剤など、組成物の安定性、無菌性、および等張性を増進する種々の添加剤を添加することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗かび剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって保証され得る。多くの場合、等張剤、例えば、砂糖、塩化ナトリウムなどを含めるのが望ましい。注射可能な剤形の持続性吸収は、吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムやゼラチンを使用することでもたらされる。しかしながら、本発明によれば、使用される任意のビヒクル、希釈剤、または添加剤は化合物と相容でなければならない。

【００６３】
注射可能な無菌溶液は、本発明を実施する上で使用される化合物を、所望により種々の量のその他の成分と共に、必要量の適当な溶剤中に取込むことにより調製し得る。

例えば治療化合物を含む本発明の医薬組成物は、任意の相容性担体、例えば種々のビヒクル、アジュバント、添加剤、および希釈剤を含む注射可能な製剤で患者に投与することができる。または、化合物は、持続放出皮下インプラントまたは標的化送達系、例えばモノクローナル抗体、イオン導入、ポリマー基質、リポソーム、およびミクロスフィアの形態で患者に非経口投与し得る。

【００６４】
本発明に使用される医薬組成物は患者に経口投与し得る。錠剤、懸濁液、溶液、エマルジョン、カプセル、粉末、シロップなどでの化合物の投与のような慣用法を使用し得る。化合物を経口または経静脈によって送達すると共に生物活性を維持する周知の方法が好ましい。

【００６５】
一実施態様においては、本発明の組成物を最初に投与した後、更に投与して維持する。例えば、本発明の組成物を一種の組成物で投与した後、別種または同種の組成物を投与することができる。例えば、本発明の組成物を、静脈注射によって投与して血中濃度を適当な濃度にまで高める。次いで、経口投薬形態によって患者のレベルを維持する。これは、患者の状態によって、他の投与形態でもよい。

【００６６】
ヒトは一般にマウスや他の実験動物よりも長期にわたり処置を受け、処置は、疾患の進行期間や薬剤有効性に見合った期間となることに留意されたい。投薬は、単回投薬または数日間にわたる複数回投薬とし得るが、単回投薬が好ましい。故に、過度の実験をせずと

も、本開示、本明細書の引用文献、および技術分野の知識から得られる技法によって、ラット、マウスなどの動物実験からヒトに拡張することができる。
処置は一般に、疾患の進行期間、薬剤有効性、および処置対象患者に見合った期間となる。
【００６７】
投与される医薬組成物の量は、処置対象患者によって変化する。好ましい実施態様においては、２×１０^{4}～１×１０^{5}個の幹細胞および１日当たり５０～５００μｇ／ｋｇのサイトカインを患者に投与した。マウスとヒトでは心臓の大きさが明らかに異なるが、２×１０^{4}～１×１０^{5}個の幹細胞がヒトにおいて十分である可能性がある。しかしながら、有効用量の正確な決定は、体格、年齢、梗塞サイズ、損傷からの経過時間など、患者に固有の要因に基づき行われる。従って、投与量は本開示および技術分野の知識から当業者によって容易に確定され得る。故に、当業者は、組成物中のおよび本発明の方法において投与されるべき化合物および任意の添加剤、ビヒクル、および／または担体の量を容易に決定し得る。典型的には、任意の添加剤（活性幹細胞および／またはサイトカインに加えての）は、リン酸緩衝生理食塩水中０．００１から５０ｗｔ％溶液の量で存在し、有効成分は、マイクログラムからミリグラムのオーダーで、例えば約０．０００１から約５ｗｔ％、好ましくは約０．０００１から約１ｗｔ％、最も好ましくは約０．０００１から約０．０５ｗｔ％、または約０．００１から約２０ｗｔ％、好ましくは約０．０１から約１０ｗｔ％、最も好ましくは約０．０５から約５ｗｔ％の量で存在する。勿論、動物またはヒトに投与される任意の組成物に対して、更に任意の特定の投与方法に対して、適当な動物モデル、例えばマウスなどのげっ歯類において致死量（ＬＤ）およびＬＤ$_{５０}$を決定することにより毒性を決定すること、および、適当な応答を引き出す組成物の投与量、組成物成分の濃度、組成物の投与タイミングを決定することが好ましい。このような決定には、当業者の知識、本開示、本明細書の引用文献から、過度の実験は必要でない。逐次投与の時間は過度の実験をせずとも確定される。
【００６８】
更に、当業者は、１種以上のサイトカインと併用される適当な薬剤を、過度の実験をせずとも、確定できるし、当業者は、体格、年齢、梗塞サイズ、損傷からの経過時間など、患者に固有の要因に基づいて有効用量を正確に決定することができる。従って、投与量は、本開示および技術分野の知識から当業者によって容易に決定され得る。
【００６９】
本発明の治療薬を含む組成物の例としては、口腔、鼻腔、肛門、膣、経口、胃内、粘膜（例えば、経舌、歯槽、歯肉、嗅覚、または呼吸器粘膜）投与用の開口部用液体製剤、例えば懸濁液、シロップ、またはエリキシル剤などの投与、および、非経口、皮下、皮内、筋肉内、または静脈内投与（例えば、注射投与）用の製剤、例えば無菌懸濁液またはエマルジョンが挙げられる。かかる組成物は、適当な担体、希釈剤、または賦形剤、例えば無菌水、生理食塩水、グルコースなどと混合してもよい。組成物は凍結乾燥することもできる。組成物は、投与経路および所望の製剤に応じて、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤、ゲル化または増粘用添加剤、保存剤、香味剤、着色剤などの補助剤を含むことができる。過度の実験をせずとも、参照により本明細書に包含される“ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ‘Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥ”第１７版、１９８５年などの標準教科書を参照して適当な製剤を調製することができる。
【００７０】
本発明の組成物は、液体製剤、例えば等張性水溶液、懸濁液、エマルジョン、または粘稠組成物として都合よく提供され、これらは選択されたｐＨに緩衝され得る。消化管吸収が好ましい場合には、本発明の組成物は、丸薬、錠剤、カプセル、カプレットなどの「固相」形態であり得、徐放性又は液体充填物、例えばゼラチンが胃内で溶解して消化管送達を果たすゼラチン被服液体も、「固相」製剤に含まれる。鼻腔または呼吸器（粘膜）投与が望まれる場合、組成物は、圧搾式噴霧ディスペンサ、ポンプ式ディスペンサ、またはエーロゾルディスペンサの形態で投与され得る。エーロゾルは通常は炭化水素による圧力下

にある。ポンプ式ディスペンサは一定用量、または特定の粒径を持つ用量を分配できるので好ましい。

【００７１】

本発明の組成物は、特に経口投与の場合にはより興味をそそるように、薬学的に許容可能な香料および／または着色剤を含むことができる。粘稠組成物は、ゲル、ローション、軟膏、クリーム（例えば経皮投与用）などの形態とし得、典型的には、粘度を２５００から６５００ｃｐｓとするのに十分な量の増粘剤を含むが、１０，０００ｃｐｓまでのより粘稠な組成物を用いてもよい。粘稠組成物は２５００から５０００ｃｐｓの粘度を有するのが好ましく、この範囲以上であると投与が困難になる。しかしながら、上記範囲以上であれば、組成物は固相またはゼラチンに近付き、経口嚥下丸薬として容易に投与され得る。

【００７２】

液体製剤は、通常は、ゲル、他の粘稠組成物、固相組成物より容易に調製される。更に、液体組成物は、特に注射や経口によって、幾分投与に都合が良い。他方で、粘稠組成物は、胃の内膜または鼻腔粘膜などの粘膜と長時間接触するよう、適当な粘度で処方し得る。

【００７３】

明らかに、適当な担体その他の添加物の選択は、厳密な投与経路、特定の投与形態の特性、例えば液体投与形態か（例えば組成物が溶液、懸濁液、ゲルまたはその他の液体形態に処方されるか）、固相投与形態か（例えば組成物が丸薬、錠剤、カプセル、カプレット、徐放性形態または液体充填形態に処方されるか）に従う。

【００７４】

溶液、懸濁液、およびゲルは通常は活性化合物に加えて大量の水（好ましくは精製水）を含む。少量のその他の成分、例えばｐＨ調整剤（例えばＮａＯＨなどの塩基）、乳化剤または分散剤、緩衝剤、保存剤、湿潤剤、ゲル化剤（例えばメチルセルロース）、着色剤、および／または香料も存在し得る。組成物は等張性、即ち血液や涙液と同じ浸透性を有することができる。

【００７５】

本発明の組成物の所望の等張性は、塩化ナトリウム、その他の薬学的に許容可能な薬剤、例えばデキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロプレングリコール、その他の無機または有機溶質を用いて達成することができる。塩化ナトリウムは、特にナトリウムイオンを含む緩衝剤に好ましい。

【００７６】

組成物の粘度は薬学的に許容可能な増粘剤を用いて選択したレベルに維持し得る。容易に且つ経済的に入手できると共に扱い易いことから、メチルセルロースが好ましい。他の適当な増粘剤としては、キサンタンゴム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが挙げられる。増粘剤の好ましい濃度は選択した増粘剤による。重要なことは、選択した粘度を達成する量を使用することである。粘稠組成物は通常は上記のような増粘剤を添加することにより溶液から調製される。

【００７７】

薬学的に許容可能な保存剤を用いて、組成物の有効期間を延長することができる。ベンジルアルコールが適当であるが、例えばパラベン、チメロサール、クロロブタノール、ベンザルコニウムクロリドといった種々の保存剤を使用し得る。保存剤の適当な濃度は、全重量に対して０．０２％から２％であるが、選択した保存剤に応じて変動し得る。

【００７８】

当業者には、組成物の成分は、活性化合物に関して化学的に不活性であるよう選択されるべきであることが認識される。これは、化学および医薬分野の当業者にとって何ら問題を提示せず、または標準教科書を参照したり、単純な実験（過度の実験を含まない）によって、本開示および本明細書引例から、問題は容易に回避される。

【００７９】

本発明の組成物は、慣用の手順に従って成分を混合することにより調製される。例えば、選択された成分をブレンダまたは標準装置内で単に混合し、濃縮混合物を製造し、次いでそれに水または増粘剤を添加することにより最終濃度および粘度に調整し、場合によって緩衝剤を添加してｐＨを調整したり、別の溶質を添加して等張性を調整する。一般に、ｐＨは約３から７．５とし得る。組成物は、年齢、性別、体重、患者の状態、投与される組成物の形態（例えば固体か液体か）などの要素を考慮した投与量で、および医学および獣医学当業者には周知の技法で、投与され得る。ヒトその他の動物の投与量は、本開示、本明細書引例、技術分野の知識から、過度の実験をせずとも、当業者によって決定され得る。

【００８０】

初回投与および追加投与または逐次投与に適当な方式は様々であり、初回投与のあと後続投与を行うことができるが、言うまでもなく、本開示、本明細書引例、技術分野の知識から、当業者によって決定され得る。

【００８１】

本発明の医薬組成物は、心血管疾患、例えば、但し限定的ではないが、アテローム性動脈硬化、虚血、高血圧、再狭窄、狭心症、リウマチ性心疾患、先天性心血管障害、動脈炎症、およびその他の動脈、細動脈、および毛細血管疾患または関連症状の処置に使用される。従って、本発明は、１つ以上の上記症状または心臓衰弱を含むその他の症状の処置または予防のために、本明細書に記載されるような幹細胞を、単独でまたは本明細書に記載されるような１種以上のサイトカインと組合せて投与すること、並びに、かかる処置または予防のための組成物、かかる組成物を処方するための、本明細書に記載の幹細胞の、単独でのまたは本明細書に記載の１種以上のサイトカインと組合せての使用、および、かかる組成物を調製するためおよび／またはかかる処置もしくは予防のための、本明細書に記載されるような幹細胞を、単独でまたは本明細書に記載のごとき１種以上のサイトカインと一緒に含むキットに関わる。有利な投与経路としては、上記症状を処置するのに最適なもの、例えば、但し限定的ではないが、静脈内、動脈内、粘膜内、腹腔内、心筋内、経内皮、経心外膜、経鼻腔投与など皮下または非経口注射によるもの、並びに、髄腔内、輸液法などが挙げられる。

【００８２】

本発明の一実施態様においては、冠状動脈または血管の閉塞を含め、血管障害または疾患の処置のための方法および組成物が提供される。本発明は、心臓バイパス手術の代替法としてまたは併用法としての治療措置に使用され得る方法および組成物を提供する。本発明は、活性化幹細胞、好ましくは活性化心臓幹細胞の単離、増殖、活性化、それが必要な脈管系の領域への移植、または送達を提供する。送達または移植は、本明細書に記載のまたは当業者には周知の任意の方法、例えば、但し限定的ではないが、処置領域の可視化が可能であり、治療薬がカテーテル系に付随する伸縮可能なニードルを通して送達されるＮＯＧＡカテーテル系の使用によって実現され得る。当業者は、例えばその全内容が本明細書に包含されるＤａｗｎ、２００５年に記載のものなど、本発明に利用し得る他の有効な送達または移植法を認識するであろう。

【００８３】

さらなる実施態様においては、本明細書に記載の心臓疾患または血管性疾患の１つに対する治療処置が必要な患者から、心臓組織を採取する。本発明は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養および増殖される幹細胞、好ましくは心臓幹細胞、より好ましくはｃ－ｋｉｔ^{POS}心臓幹細胞の単離を提供する。

【００８４】

更に別の実施態様においては、本発明は、幹細胞、好ましくは心臓幹細胞、より好ましくはｃ－ｋｉｔ^{POS}心臓幹細胞の培養および増殖に使用される培地を提供する。かかる培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、患者血清、インシュリン、トランスフェリン、および亜セレン酸ナトリウムを含み得る。一実施態様においては、培地は更に１種以上のヒト組換えｂ

ＦＧＦ、ヒト組換えＥＧＦ、ウリジン、およびイノシンを含み得る。

【００８５】

一実施態様においては、培地の成分は以下の概算範囲で存在し得る：

成分	最終濃度
患者血清	５～２０重量％
ヒト組換えｂＦＧＦ	１０～１００ｎｇ／ｍＬ
ヒト組換えＥＧＦ	１０～１００ｎｇ／ｍＬ
インシュリン	２～２０μｇ／ｍＬ
トランスフェリン	２～２０μｇ／ｍＬ
亜セレン酸ナトリウム	２～１０ｎｇ／ｍＬ
ウリジン	０．２４～２．４４ｍｇ／ｍＬ
イノシン	０．２７～２．６８ｍｇ／ｍＬ

【００８６】

別の実施態様においては、当業者には周知のような培地の成分の置換が行われ得る。例えば、インシュリンはインシュリン様増殖因子Ｉで置換され得る。ウリジンおよびイノシンは、アデノシン、グアノシン、キサンチン、チミジン、およびシチジンを含む他のヌクレオチドの混合物で置換され得る。

本発明の一実施態様においては、上記培地は、心臓の損傷または梗塞領域での心筋再生または新しい心筋生成のために投与される幹細胞の培養および増殖に使用され得る。

【００８７】

本発明の別の実施態様においては、培養および増殖された幹細胞、好ましくは心臓幹細胞、より好ましくはｃ－ｋｉｔ^{POS}心臓幹細胞は、移植または送達の前に活性化される。一実施態様においては、幹細胞を１種以上の増殖因子と接触させる。適当な増殖因子は、限定的ではないが、次のものを含め本明細書に記載のもののいずれともし得る：アクチビンＡ、アンギオテンシンＩＩ、骨形成プロテイン２、骨形成プロテイン４、骨形成プロテイン６、カルジオトロフィン－１、線維芽細胞増殖因子１，線維芽細胞増殖因子４、Ｆｌｔ３リガンド、グリア由来神経栄養因子、ヘパリン、肝細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子－Ｉ、インシュリン様増殖因子－ＩＩ、インシュリン様増殖因子結合プロテイン－３、インシュリン様増殖因子結合プロテイン－５、インターロイキン－３、インターロイキン－６、インターロイキン－８、白血病阻害因子、ミッドカイン、血小板由来増殖因子ＡＡ、血小板由来増殖因子ＢＢ、プロゲステロン、プトレッシン、幹細胞因子、間質由来因子－１、トロンボポエチン、形質転換増殖因子－α、形質転換増殖因子－β１、形質転換増殖因子－β２、形質転換増殖因子－β３、血管内皮増殖因子、Ｗｎｔ１，Ｗｎｔ３ａ、およびＷｎｔ５ａ。これらは、Ｋｏ，２００６；Ｋａｎｅｍｕｒａ，２００５；Ｋａｐｌａｎ，２００５；Ｘｕ，２００５；Ｑｕｉｎｎ，２００５；Ａｌｍｅｉｄａ，２００５；Ｂａｒｎａｂｅ－Ｈｅｉｄｅｒ，２００５；Ｍａｄｌａｍｂａｙａｎ，２００５；Ｋａｍａｎｇａ－Ｓｏｌｌｏ，２００５；Ｈｅｅｓｅ，２００５；Ｈｅ，２００５；Ｂｅａｔｔｉｅ，２００５；Ｓｅｋｉｙａ，２００５；Ｗｅｉｄｔ，２００４；Ｅｎｃａｂｏ，２００４；およびＢｕｙｔａｅｒｉ－Ｈｏｅｆｅｎ，２００４に記載されており、これらは全編が参照により本明細書に包含される。当業者は、１種以上の適当な増殖因子を選択することができる。好ましい一実施態様においては、幹細胞は、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）および／またはインシュリン様増殖因子－１（ＩＧＦ－１）と接触される。一実施態様においては、ＨＧＦは約０～４００ｎｇ／ｍＬの量で存在する。別の実施態様においては、ＨＧＦは、約２５、約５０、約７５、約１００、約１２５、約１５０、約１７５、約２００、約２２５、約２５０、約２７５、約３００、約３２５、約３５０、約３７５、または約４００ｎｇ／ｍＬの量で存在する。別の実施態様においては、ＩＧＦ－１が約０～５００ｎｇ／ｍＬの量で存在する。更に別の実施態様においては、ＩＧＦ－１は、約２５、約５０、約７５、約１００、約１２５、約１５０、約１７５、約２００、約２２５、約２５０、約２７５、約３００、約３２５、約３５０、客３７５、約４００、約４２５、約４５０、約４７５、または約５００ｎｇ／ｍＬの量で存在する。

【００８８】
更に別の実施態様においては、１種以上の増殖因子が本明細書において提供される培地に存在し得、例えば一実施態様においては、培地は、１種以上の増殖因子、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、患者血清、インシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウム、そして必要に応じて１種以上のヒト組換えｂＦＧＦ、ヒト組換えＥＧＦ、ウリジン、およびイノシンを含み得る。培地の成分は本明細書に記載の量で存在し得、当業者は、それに接触した任意の幹細胞を活性化するための１種以上の増殖因子の十分な量を決定し得ることが考えられる。

【００８９】
本発明の一実施態様においては、活性化された幹細胞、好ましくは心臓幹細胞、より好ましくはｃ－ｋｉｔ^{POS}心臓幹細胞は、治療または修復を必要とする脈管系の領域に送達または移植される。例えば、一実施態様においては、活性化された幹細胞は、閉塞した心血管または心臓動脈の部位に送達または移植される。本発明の一実施態様においては、ｃ－ｋｉｔ^{POS}であり且つｆｌｉｋ－１エピトープを含む心臓幹細胞が、治療または修復を必要とする領域に送達または移植される。別の実施態様においては、活性化された幹細胞が、幹細胞が送達または移植された部位において動脈または血管を形成する。更に別の実施態様においては、形成された動脈または血管は１００μｍ以上の直径を有する。更に別の実施態様においては、形成された動脈または血管は、少なくとも１２５、少なくとも１５０、少なくとも１７５、少なくとも２００、少なくとも２２５、少なくとも２５０、または少なくとも２７５μｍの直径を有する。更に別の実施態様においては、形成された動脈または血管は、閉塞部の周囲を含め、治療または修復を必要とする領域の周囲に「生体的バイパス」を提供し、血流、血圧、血液循環を回復または向上させる。本発明の更に別の実施態様においては、活性化された幹細胞の投与は、他の治療手段、例えば、但し限定的ではないが、１種以上の増殖因子を含む他の治療薬の投与と一緒に行い得る。

【００９０】
本発明の医薬組成物は、治療剤として、即ち治療用途に使用し得る。本明細書において、「処置」および「治療」は、治癒効果、緩和効果、予防効果を含む。
本明細書において、「患者」は、例えば、但し限定的ではないが、ヒト、哺乳動物、爬虫類、両生類、魚類を含む任意の脊髄動物を包含する。しかしながら、患者は、ヒトまたは哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、馬といった飼育動物や、ウシ、ヒツジ、ブタといった生産動物であるのが有利である。

【００９１】
本明細書において、「体細胞性幹細胞」または「幹細胞」または「造血細胞」とは、骨髄、末梢血、その他の資源から得ることができる自系(autologous)または同種(allogenic)幹細胞を指す。
本明細書において、「成体」幹細胞は、その起源が胎児ではなく、胎児または胎生組織に由来しない幹細胞を刺す。

【００９２】
本明細書において、「損傷後まもない心筋」とは、処置開始前１週間以内に損傷した心筋を指す。好ましい一実施態様においては、心筋は処置開始前３日以内に損傷している。さらに好ましい実施態様においては、心筋は処置開始前１２時間以内に損傷している。幹細胞を、単独でまたは本明細書に記載のサイトカインと併用して、損傷後まもない心筋に適用するのが有利である。

【００９３】
本明細書において、「損傷心筋」とは、虚血状態に暴露された心筋細胞を指す。虚血状態は、心筋梗塞または他の心血管疾患または関連症状によって惹起され得る。酸素欠乏は周辺域の細胞の死を招き、梗塞を残し、それが最終的に瘢痕となる。
本明細書において、「ホーミング」とは、体細胞性幹細胞の、損傷した心筋および／または心筋細胞への誘引および移動を指す。

【００９４】

本明細書において、「集成(assemble)」とは、分化した体細胞性幹細胞の、機能的構造体、例えば心筋および／または心筋細胞、冠状動脈、細動脈および毛細血管などへの集成を指す。集成により、分化した心筋および／または心筋細胞、冠状動脈、細動脈および毛細血管に機能性が与えられる。

【００９５】

即ち、本発明は体細胞性幹細胞の使用に関する。これらは、動物中に少量で存在するが、幹細胞を回収する方法は当業者には周知である。

本発明の別の態様においては、幹細胞はＬｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅであるよう選択される。「Ｌｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅ」なる用語は当業者には周知であり、細胞が特定の細胞系に特徴的な抗原を発現しないことを意味する。

【００９６】

Ｌｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅ幹細胞はｃ－ｋｉｔ陽性であるよう選択されるのが有利である。「ｃ－ｋｉｔ」なる用語は当業者には周知であり、幹細胞の表面に存在すること知られおり、幹細胞を同定し、周辺細胞から分離する過程で常用されているレセプターである。

【００９７】

本発明は更に、心臓に適用される治療有効用量または治療有効量の幹細胞に関わる。有効用量は、有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。前記用量は、１回以上の投与で投与される。以下の実施例においては、マウスモデルで$２×１０^{４}$～$１×１０^{５}$個の幹細胞が投与された。マウスとヒトでは明らかに心臓の大きさが異なるが、上記範囲の幹細胞がヒトでも十分であろう可能性がある。しかしながら、有効用量の正確な決定は、体格、年齢、梗塞サイズ、損傷からの経過時間など、患者に固有の要因に基づいて行われる。当業者、特に内科医または心臓内科医は、過度の実験をせずとも、有効用量を構成する幹細胞の数を決定し得るであろう。

【００９８】

本発明の別の態様においては、幹細胞は心臓、特に梗塞の境界領域に送達される。当業者には承知されるように、梗塞領域は目視可能であり、この特定の幹細胞配置が可能となる。

幹細胞は、注射、特に心筋内注射によって投与されるのが有利である。当業者には承知されるように、心臓は機能筋であるので、これは好ましい幹細胞送達法である。幹細胞を心臓に注射することにより、心臓の収縮運動によって幹細胞が失われないことが保証される。

【００９９】

本発明の別の態様においては、幹細胞が注射によって経心内膜または経心外膜投与される。この好ましい実施態様は幹細胞を保護周囲膜に浸透させるものであり、細胞を心筋内注射する実施態様で必要とされる。

【０１００】

本発明の好ましい一実施態様は、経心内膜注射液を送達するためにカテーテル方式の使用を含む。カテーテルの使用により、胸腔の切開を必要とする他のより侵襲的な方法が排除される。当業者には承知されるように、本明細書に概略を示すカテーテル方式を含む侵襲がより少ない方法によって、最適回復時間が可能となる。

【０１０１】

カテーテル方式は、ＮＯＧＡカテーテルまたは類似の系の技術の使用を含む。ＮＯＧＡカテーテル系は、問題の領域の電気機械マッピングと、目的の注射液を送達するまたは目的の領域に治療薬を浴びせる伸縮可能ニードルを備えることにより誘導投与を容易にする。本発明の任意の実施態様は、注射液を送達する、即ち治療薬を供給するためのシステムの使用によって投与され得る。当業者には、撮像と、本発明に使用し得るカテーテル送達系の一体化によって目的の処置を行う能力を提供する別の系が認識されよう。ＮＯＧＡおよび類似の系の使用に関する情報は、例えばＳｈｅｒｍａｎ，２００３およびＰｅｒｒｉｎ，２００３に見ることができ、これらの本文は全体が参照により本明細書に包含される

。

【０１０２】

本発明の別の実施態様では、幹細胞を、梗塞領域に移動させ、筋細胞、平滑筋細胞、および内皮細胞に分化させる。上記細胞種は、構造的および機能的完全性を回復するために存在せねばならないことは当業界で周知である。梗塞又は虚血組織を修復する他の方法では、米国特許第６，１１０，４５９号および第６，０９９，８３２号にあるように、上記細胞を心臓に直接または培養グラフトとして移植する。

【０１０３】

本発明の別の実施態様は、分化細胞の増殖、並びに、細胞による、冠状動脈、細動脈、毛細血管、心筋などの心臓構造体の形成を含む。当業者には承知されるように、上記構造体は全て適正な心臓機能に不可欠である。文献にも示されるように、内皮細胞および平滑筋細胞などの細胞を移植すると、移植細胞は梗塞領域内で生存できるが、必要な構造体を形成して心臓機能を完全に回復させることはできない。機能的および構造的完全性を回復する能力は本発明の更に別の態様である。

【０１０４】

本発明の別の態様はサイトカインの投与に関わる。このサイトカインは一群のサイトカインから選択され得、サイトカインの組合せを含み得る。幹細胞因子（ＳＣＦ）および顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）は、幹細胞の血流への移動を惹起する刺激因子として当業者には周知である（Ｂｉａｎｃｏ　ｅｔ　ａｌ，２００１，Ｃｌｕｔｔｅｒｂｕｃｋ，　１９９７，　Ｋｒｏｎｅｗｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ，　２０００，Ｌａｌｕｐｐａ　ｅｔ　ａｌ，　１９９７，Ｐａｔｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ，　１９９８）。間質細胞由来因子－１は幹細胞可動化を化学的に刺激することが示されており、ｓｔｅｅｌ　ｆａｃｔｏｒは化学的特性および化学運動的特性を有する（Ｃａｃｅｒｅｓ－Ｃｏｒｔｅｓ　ｅｔ　ａｌ，　２００１，　Ｊｏ　ｅｔ　ａｌ，　２０００，　Ｋｉｍ　ａｎｄ　Ｂｒｏｘｍｅｙｅｒ，　１９９８，　Ｉｋｕｔａ　ｅｔ　ａｌ，　１９９１）。血管内皮増殖因子は、可動化に際しての移動を容易にする助けとなるパラクリンループに関与すると推測されている（Ｂａｕｔｚ　ｅｔ　ａｌ，　２０００，　Ｊａｎｏｗｓｋａ－Ｗｉｅｃｚｏｒｅｋ　ｅｔ　ａｌ，　２００１）。マクロファージコロニー刺激因子および顆粒球マクロファージ刺激因子は、幹細胞の可動化を刺激することにより、ＳＣＦおよびＧ－ＣＳＦと同様に機能することが示されている。インターロイキン－３は幹細胞の可動化を刺激することが示されており、他のサイトカインとの併用で特に効能がある。

【０１０５】

サイトカインは、サイトカインをｉｎ　ｖｉｖｏ発現するベクターを介して投与し得る。ｉｎ　ｖｉｖｏ発現用ベクターは、ウイルスベクター、例えばアデノウイルス、ポックスウイルス（ワクシニアウイルス、カナリア痘ウイルス、ＭＶＡ、ＮＹＶＡＣ、ＡＬＶＡＣなど）、レンチウイルス、またはＤＮＡプラスミドベクターなど、参照により本明細書に包含される文献に記載のまたは業界で使用される、ベクターまたは細胞または発現系とし得る。サイトカインは、上記ベクターまたは細胞または発現系、或いはバキュロウイルス発現系、Ｅ．Ｃｏｌｉなどの細菌ベクター、およびＣＨＯ細胞などの哺乳動物細胞を介したｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現に由来してもよい。例えば、米国特許第６，２６５，１８９号、第６，１３０，０６６号、第６，００４，７７７号、第５，９９０，０９１号、５，９４２，２３５号、５，８３３，９７５号を参照されたい。サイトカイン組成物は、幹細胞調製に有利または好ましいとされるのに、記載されたもの以外の経路で投与し得るが、サイトカイン組成物は、幹細胞調製に有利または好ましいと記載された経路で投与されるのが有利である。

【０１０６】

本発明の別の態様は、治療有効用量または治療有効量のサイトカインの投与に関わる。有効用量は、有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。前記用量は一回以上の投与で投与される。好ましい一実施態様においては、用量は、治療開始後約２、３日の間に与えられる。しかしながら、有効用量の正確な決定は、体格、年齢、梗塞サイ

ズ、投与されるサイトカインまたはサイトカインの組合せ、損傷からの経過時間など、患者に固有の要因に基づいて行われる。当業者、特に内科医または心臓内科医は、過度の実験をせずとも、有効用量を構成するサイトカインの十分な量を決定し得るであろう。

【０１０７】

本発明は更に、注射、特に皮下または静脈内注射によって送達される、治療有効用量または治療有効量のサイトカインの投与に関わる。当業者には、皮下注射または静脈内送達はかなり一般的であり、時宜を得た摂取および血流への循環を可能とする、特定用量を送達する有効な方法であることが承知される。

【０１０８】

本発明の別の態様は、患者の幹細胞を刺激し、血流中の可動化を惹起する投与サイトカインを含む。前記したように、所与のサイトカインは、前記可動化を促進する能力があることが当業者には周知である。

【０１０９】

有利には、一旦幹細胞が血流中に可動化されたならば、以下の実施例で明らかになるように、幹細胞は心臓の損傷領域にホーミングする。

本発明の別の実施態様は、梗塞領域に移動し、筋細胞、平滑筋細胞、および内皮細胞に分化する幹細胞に関わる。これらの細胞種は、構造的および機能的完全性を回復するために存在せねばならないことが業界において知られている。

【０１１０】

本発明の別の実施態様は、有効量の１種以上のサイトカインを梗塞領域に投与することを含む。有効用量は、有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。前記用量は一回以上の投与で投与される。しかしながら、有効用量の正確な決定は、体格、年齢、梗塞サイズ、投与されるサイトカインまたはサイトカインの組合せ、損傷からの経過時間など、各患者に固有の要因に基づいて行われる。当業者、特に内科医または心臓内科医は、過度の実験をせずとも、有効用量を構成するサイトカインの十分な量を決定し得るであろう。

【０１１１】

本発明の更に別の実施態様は、有効量の１種以上のサイトカインを心臓に注射によって投与することを含む。好ましくは、サイトカインは梗塞領域にまたは梗塞領域に隣接する領域に送達される。当業者には承知されるように、梗塞領域は目視可能であり、この特定のサイトカイン配置が可能である。

【０１１２】

サイトカインは注射、特に心筋内注射によって投与されるのが有利である。当業者には承知されるように、心臓は機能筋であるので、これは好ましいサイトカイン送達方法である。サイトカインを心臓に注射することで、心臓の収縮運動によってサイトカインが失われないことが保証される。

【０１１３】

本発明の別の態様においては、サイトカインが注射によって経心内膜または経心外膜投与される。この好ましい実施態様はサイトカインを保護周囲膜に浸透させるものであり、サイトカインが心筋内注射される実施態様で必要とされる。

【０１１４】

本発明の好ましい一実施態様は、経心内膜注射液を送達するためにカテーテル方式の使用を含む。カテーテルの使用により、胸腔の切開を必要とする他のより侵襲的な方法が排除される。当業者には承知されるように、本明細書に概略を示すカテーテル方式を含む侵襲がより少ない方法によって、最適回復時間が可能となる。

【０１１５】

本発明の別の実施態様は、単回投与によるサイトカインの送達を含む。本発明の更に別の実施態様は、同じ用量のサイトカインを心臓に複数回投与することを含む。本発明の更に別の実施態様は、複数用量のサイトカインを勾配が形成されるように心臓に投与することを含む。

本発明の更に別の実施態様は、常在心臓幹細胞の刺激、移動、増殖、および／または分化を含む。

【０１１６】

本発明の別の実施態様は、分化細胞の増殖と、細胞による、冠状動脈、細動脈、毛細血管、心筋を含む心臓構造体の形成を含む。当業者には承知されるよう、これらの構造体は適正な心臓機能に重要である。文献に示されているように、内皮細胞および平滑筋細胞などの細胞を移植すると、移植細胞は梗塞領域内で生存できるが、必要な構造体を形成して心臓機能を完全に回復させることはできない。機能的および構造的完全性、または、従来技術よりも良い機能的および構造的完全性を回復する能力は本発明の更に別の態様である。

【０１１７】

本発明を実施する際には、幹細胞投与とサイトカイン投与を行って、最も効果的な損傷心筋修復方法を保証することが好ましい。

本発明に使用される幹細胞はＬｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅであるよう選択することが有利である。「Ｌｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅ」なる用語は当業者には周知であり、細胞が特定の細胞系に特徴的な抗原を発現しないことを意味する。Ｌｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅ幹細胞はｃ－ｋｉｔ陽性であるよう選択されるのが有利である。「ｃ－ｋｉｔ」なる用語は当業者には周知であり、幹細胞の表面に存在すること知られおり、幹細胞を同定し、周辺細胞から分離する過程で常用されているレセプターである。

【０１１８】

所定の実施態様においては、治療有効用量の幹細胞が、心臓に適用、送達、または投与されるか、或いは心臓に移植される。有効用量または有効量は、有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。前記用量は、１回以上の投与で投与され得る。以下の実施例においては、マウスモデルで$２×１０^{４}$～$１×１０^{５}$個の幹細胞が投与された。マウスとヒトでは心臓に明らかな大きさの違いがあるが、$２×１０^{４}$～$１×１０^{５}$個の幹細胞がヒトでも十分であろう可能性がある。しかしながら、有効用量の正確な決定は、体格、年齢、梗塞サイズ、損傷からの経過時間など、各患者に固有の要因に基づいて行われる。当業者、特に内科医または心臓内科医は、過度の実験をせずとも、本開示および技術分野の知識から、有効用量を構成する幹細胞の数および種類を決定し得るであろう。この点において、また一般的に製剤の調製および製剤またはその成分の投与に関して、実施例でも教示に言及しており、当業者は、実施例に使用された動物の体重と比較した上で、処置対象患者の体重に基づいて投与量、量などを決定し得る。幹細胞は骨髄または心臓幹細胞であるのが有利である。より有利には、幹細胞は成人骨髄（造血幹細胞）または成人心臓幹細胞またはこれらの組合せ、或いは心臓幹細胞の組合せ、例えば成人心臓幹細胞と別種の幹細胞、例えば別種の成人幹細胞との組合せである。

【０１１９】

本発明の別の態様においては、幹細胞が心臓に、特に梗塞の境界領域に送達される。当業者には承知されるように、梗塞領域は目視可能であり、この特定の幹細胞配置が可能である。

幹細胞は、注射、特に心筋内注射によって投与されるのが有利である。当業者には承知されるように、心臓は機能筋であるので、これは好ましい幹細胞送達法である。幹細胞を心臓に注射することにより、心臓の収縮運動によって幹細胞が失われないことが保証される。

【０１２０】

本発明の別の態様においては、幹細胞が注射によって経心内膜または経心外膜投与される。この好ましい実施態様は幹細胞を保護周囲膜に浸透させるものであり、細胞が心筋内注射される実施態様で必要とされる。

本発明の好ましい一実施態様は、経心内膜注射液を送達するためにカテーテル方式の使用を含む。カテーテルの使用により、胸腔の切開を必要とする他のより侵襲的な方法が排除される。当業者には承知されるように、本明細書に概略を示すカテーテル方式を含む侵

襲がより少ない方法によって、最適回復時間が可能となる。

【０１２１】

本発明の実施態様はサイトカインの投与を含み得る。このサイトカインは一群のサイトカインから選択され得、サイトカインの組合せを含み得る。

本発明の別の態様は、治療有効用量のサイトカインの投与を含む。有効用量は、有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。前記用量は一回以上の投与で投与される。好ましい一実施態様においては、用量は、治療開始後約２、３日の間に与えられる。しかしながら、有効用量の正確な決定は、体格、年齢、梗塞サイズ、投与されるサイトカインまたはサイトカインの組合せ、損傷からの経過時間など、各患者に固有の要因に基づいて行われる。当業者、特に内科医または心臓内科医は、過度の実験をせずとも、特に本開示および技術分野の知識から、有効用量を構成するサイトカインの十分な量を決定し得るであろう。

【０１２２】

治療有効用量の少なくとも１種のサイトカインの投与は注射によって、特に皮下または静脈内投与するのが有利である。当業者には、皮下注射または静脈内送達はかなり一般的であり、時宜を得た摂取および血流への循環を可能とする、有効な特定用量送達法であることが承知される。

【０１２３】

本発明の別の態様は、患者の幹細胞を刺激し、血流中への可動化を惹起する投与サイトカインを含む。前記したように、所与のサイトカインは、前記可動化を促進する能力があることが当業者には周知である。ここでも、一旦幹細胞が血流中に可動化されたならば、幹細胞は心臓の損傷領域にホーミングする。即ち、所定の実施態様においては、移植幹細胞と可動化幹細胞が梗塞領域に移動し、筋細胞、平滑筋細胞、および内皮細胞に分化する。これらの細胞種は、構造的および機能的完全性を回復するために存在するのが有利であることが知られている。

【０１２４】

本発明の別の実施態様は、分化細胞の増殖と、細胞による、冠状動脈、細動脈、毛細血管、および心筋を含む心臓構造体の形成を含む。当業者には承知されるように、上記構造体は全て適正な心臓機能に不可欠である。文献に示されているように、内皮細胞および平滑筋細胞などの細胞を移植すると、移植細胞は梗塞領域内で生存できるが、必要な構造体を形成して心臓機能を完全に回復させることはない。心臓構造体は、ｅｘ　ｖｉｖｏで生成し、グラフトの形態で移植することができる。グラフトは、単独でまたは本開示のごとく幹細胞もしくは幹細胞と少なくとも１種のサイトカイン、例えば、有利には成人または心臓または造血幹細胞、具体的には成人心臓幹細胞および／または成人造血幹細胞、または成人心臓幹細胞と別種の幹細胞、例えば別種の成人幹細胞と一緒に移植される。心筋をｅｘ　ｖｉｖｏで生成および／または再生する手段は、必要に応じてサイトカインの存在下に、体細胞性幹細胞および心臓組織をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することを含む。体細胞性幹細胞はｉｎ　ｖｉｔｒｏで筋細胞、平滑筋細胞、および内皮細胞に分化・増殖し、心筋組織および／または細胞を形成する。これらの組織および細胞は集成して、動脈、細動脈、毛細血管、心筋を含む心臓構造体を形成する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで形成された組織および／または細胞を患者に、例えばグラフトによって移植して、構造的および機能的完全性を回復させる。

【０１２５】

更に、或いは、代わりに、グラフトされる組織源は、心臓グラフトに使用される他の組織源に由来するものであってもよい。

心臓組織の機能的および構造的完全性の回復または一部回復－有利には既存状態を超える－は本発明の別の態様である。

【０１２６】

従って、本発明は、別の態様において、例えば、心血管病または疾患または心臓疾患を処置する発明的方法に使用するための、体細胞性幹細胞および／または少なくとも１種の

サイトカインを含む医薬組成物などの組成物を調製する方法を包含する。
本発明は更に、本発明およびその多数の利点のより良い理解を提供する以下の非限定的な実施例によって説明される。
【０１２７】
以下の実施例において言及される材料、試薬、化学物質、アッセイ、サイトカイン、抗体、および雑品目の全てが、例えば、但し限定的ではないが、Ｇｅｎｚｙｍｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＧｉｂｃｏＢＲＬ、Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ、Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＭＢＬ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、ＣＮ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃｏｏｒｐｏｒａｔｅ、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、およびＣｅｄａｒＬａｎｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｌｉｍｉｔｅｄなどの供給業者を通して、研究施設が容易に入手可能である。
【０１２８】
例えば、
幹細胞因子はＳＣＦ（組換えヒト、組換えマウス、およびこれらに対する抗体の複数形態）の名称でＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（６１４ ＭｃＫｉｎｌｅｙ Ｐｌａｃｅ Ｎ．Ｅ．，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ， ＭＮ ５５４１３）から入手可能であり；
顆粒球コロニー刺激因子はＧ－ＣＳＦ（組換えヒト、組換えマウス、およびこれらに対する抗体の複数形態）の名称でＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓから入手可能であり；
幹細胞抗体－１はＳＣＡ－１の名称でＭＢＬ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（２００ Ｄｅｘｔｅｒ Ａｖｅｎｕｅ， Ｓｕｉｔｅ Ｄ， Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ， ＭＡ ０２４７２）から入手可能であり；
多剤耐性抗体はＡｎｔｉ－ＭＤＲの名称でＣＮ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃｏｏｒｐｏｒａｔｅから入手可能であり；
ｃ－ｋｉｔ抗体はｃ－ｋｉｔ（Ａｂ－１）ポリクローナル抗体の名称でＣＮ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃｏｏｒｐｏｒａｔｅ（Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ（Ｄａｒｍｓｔａｄｔ、ドイツ）の関連会社。本社は１０３９４ Ｐａｃｉｆｉｃ Ｃｅｎｔｅｒ Ｃｏｕｒｔ， Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ， ＣＡ ９２１２１）から入手可能である。
【実施例】
【０１２９】
実施例１：梗塞心筋の造血幹細胞（ＨＳＣ）修復
Ａ．造血幹細胞の採取
強化緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）を発現する雄トランスジェニックマウスの大腿骨および脛骨から骨髄を採取した。大腿骨および脛骨を摘出した後、筋肉を切除し、骨の上面および下面を切開し、回収用緩衝液を骨髄に浸潤させた。緩衝液と細胞を含む液体を、１．５ｍＬエッペンドルフチューブなどの試験管に回収した。骨髄細胞を５％ウシ胎児血清（ＦＣＳ）を含むＰＢＳ中に懸濁させ、以下の造血細胞系に特異的な抗マウスモノクローナル抗体と一緒に氷上でインキュベートした：ＣＤ４およびＣＤ８（Ｔリンパ球）、Ｂ－２２０（Ｂリンパ球）、Ｍａｃ－１（マクロファージ）、ＧＲ－１（顆粒球）（Ｃａｌｔａｇ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）およびＴＥＲ－１１９（赤血球）（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）。次いで細胞をＰＢＳ中で洗浄し、ヤギ抗ラット免疫グロブリン（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ Ｉｎｃ．）で被覆した磁気ビーズと一緒に３０分間インキュベートした。バイオ磁石によって細胞系陽性(lineage positive)細胞（$Ｌｉｎ^{+}$）を除去し、Ｌｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅ細胞（$Ｌｉｎ^{-}$）をＡＣＫ－４ビオチン（抗ｃ－ｋｉｔｍＡｂ）で染色した。細胞をＰＢＳ中で洗浄し、ストレプトアビジン結合フィコエリトリン（ＳＡ－ＰＥ）（Ｃａｌｔａｇ Ｌａｂｓ．）で染色し、蛍光活性化細胞分類（ＦＡＣＳ）をＦＡＣＳＶａｎｔａｇｅ器（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で実施して分類した。ＥＧＦＰおよびＡＣＫ－４－ビオチン－ＳＡ－ＥＰの励起が波長４８８ｎｍで生じた。$Ｌｉｎ^{-}$細胞を、染色強度の対数差１～２によってｃ－ｋｉｔ陽性（$ｃ－ｋｉｔ^{POS}$）およびｃ－ｋｉｔ陰性（$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}$）に分類した（図１）。$ｃ－ｋｉｔ^{POS}$細胞をＰＢＳ５μＬ中$２×１０^{４}$から$１×１０^{５}$個の濃度で懸濁させ、$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}$細胞をＰ

ＢＳ５μＬ中１×１０^{5}個の濃度で懸濁させた。

【０１３０】

Ｂ．マウスにおける心筋梗塞の誘発

２月齢の雌Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおいて、Ｌｉら（１９９７）によって記載されているように心筋梗塞を誘発した。梗塞の３～５時間後、マウスの胸腔を再度開き、梗塞に隣接する生存心筋の前面と後面にＬｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を含むＰＢＳ２．５μＬを注射した（図２）。未注射またはＬｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞を注射した梗塞マウス、および疑似手術したマウス、即ち開胸したが梗塞を誘発しなかったマウスを対照として使用した。全動物を手術の９±２日後に解剖した。プロトコルは施設内治験審査委員会によって承認されたものであった。結果は平均±ＳＤで表される。２つの測定値間の有意性はスチューデントのｔ検定によって決定し、複数比較において、ボンフェローニ法（Ｓｃｈｏｌｚｅｎ　ａｎｄ　Ｇｅｒｄｅｓ，２０００）によって評価した。Ｐ＜０．０５を有意とみなした。

【０１３１】

雄性Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}骨髄細胞を雌マウスの梗塞左心室周辺へ注射した結果、心筋が再生した。梗塞周辺領域とは梗塞に隣接する生存心筋の領域である。３０匹中１２匹のマウス（４０％）で修復が得られた。梗塞再構成の失敗は、６００拍／分（ｂｐｍ）で収縮する組織への細胞移植の困難性に起因する。しかしながら、ドナー骨髄細胞のＹ染色体上の組織適合性抗原に対する免疫反応により、一部の雌性レシピエントにおける修復欠如が説明される。密集した筋細胞は梗塞領域の６８±１１％を占め、心室の前面から後面へ広がっていた（図２Ａ～Ｄ）。Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞を注射したマウスには新しい筋細胞は見られなかった（図２Ｅ）。

【０１３２】

Ｃ．心室機能の判定

マウスを抱水クロラール（４００ｍｇ／ｋｇ体重、ｉ．ｐ．）で麻酔し、マイクロチップ血圧トランスデューサ（モデルＳＰＲ－６７１、Ｍｉｌｌａｒ）を右頸動脈にカニューレ挿入し、非開胸式処置において左心室（ＬＶ）血圧およびＬＶ＋およびｄＰ／ｄｔを測定し、ＨＳＣ移植に由来する発生筋細胞が機能に影響するか判定した。未注射またはＬｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞を注射した梗塞マウスを統計上まとめた。疑似手術群と比較し、梗塞群は心障害の徴候を示した（図３）。Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞で処置したマウスにおいては、ＬＶ拡張終期圧（ＬＶＥＤＰ）は３６％低下し、発生圧力（ＬＶＤＰ）、ＬＶ＋およびｄｐ／ｄｔはそれぞれ３２％、４０％、および４１％上昇した（図４）。

【０１３３】

Ｄ．細胞増殖判定およびＥＧＦＰ検出

腹大動脈にカニューレを挿入し、塩化カドミウム（$CdCl_2$）を注射して心臓拡張期に心臓を停止させ、１０％緩衝ホルマリンによって心筋を逆潅流した。左心室の基部から頂部に至る３種の組織片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。冠状動脈閉塞の９±２日後に、心室の梗塞部位は肉眼でも組織検査でも容易に同定できた（図２Ａ）。梗塞領域を定める心内膜面および心外膜面の長さ、左心室全体の心内膜および心外膜を各断片で測定した。次いで、それらの比を計算して、各ケースにおける平均梗塞サイズを得た。これは、顕微鏡に接続された画像分析装置を使用して倍率４倍で行った。梗塞領域を定める心内膜周長と心外膜周長の比（Ｐｆｅｆｆｅｒ　ａｎｄ　Ｂｒａｕｎｗａｌｄ，１９９０；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）は、未処置マウス（７８±１８％、ｎ＝８）と、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}（７５±１４％、ｎ＝１２）またはＬｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞（７５±１５％、ｎ＝１１）で処置した処置済マウスとで変わらなかった。

【０１３４】

Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞が心筋再生をもたらすか判定するため、ＢｒｄＵ（５０ｍｇ／ｋｇ体重、ｉ．ｐ．）を連続４～５日間、毎日動物に投与し、解剖し、活発成長期の累積細胞分裂を判定した。断片を抗ＢｒｄＵ抗体と一緒にインキュベートし、Ｓ相における心臓細胞核のＢｒｄＵ標識を測定した。更に、ウサギポリクローナル抗マウスＫｉ６

７抗体（Ｄａｋｏ　Ｃｏｒｐ）で試料を処理することにより、核内のＫｉ６７発現（Ｋｉ６７は、Ｇ１、Ｓ、Ｇ２、および早期有糸分裂において循環細胞中で発現される）を評価した。ＦＩＴＣ結合ヤギ抗ウサギＩｇＧを二次抗体として用いた（図５および図６）。ウサギポリクローナル抗ＧＦＰ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を用いてＥＧＦＰを検出した。マウスモノクローナル抗心筋ミオシン重鎖（ＭＡＢ　１５４８；Ｃｈｅｍｉｃｏｎ）またはマウスモノクローナル抗α－筋節アクチン（クローン５Ｃ５；Ｓｉｇｍａ）を用いて筋細胞を認識し、ウサギポリクローナル抗ヒトＶＩＩＩ因子（Ｓｉｇｍａ）を用いて内皮細胞を認識し、マウスモノクローナル抗α－平滑筋アクチン（クローン１Ａ４；Ｓｉｇｍａ）を用いて平滑筋細胞を認識した。核は１０μｇ／ｍＬのヨウ化プロピジウム（ＰＩ）で染色した。ＢｒｄＵおよびＫｉ６７で標識された筋細胞（Ｃ）、内皮細胞（ＥＣ）、および平滑筋細胞（ＳＭＣ）の核の比率を共焦点顕微鏡検査で得た。これは、標識核数を調査核総数で割り算することで行った。各細胞集団における抽出核数は次の通りであった；ＢｒｄＵ標識：Ｍ＝２，９０８；ＥＣ＝２，１５３；ＳＭＣ＝４，８７７。Ｋｉ６７標識：Ｍ＝３，７７１；ＥＣ＝４，０５１；ＳＭＣ＝４，７５２。ＥＧＦＰ標識に対してカウントされた細胞数：Ｍ＝３，２７８；ＥＣ＝２，０５６；ＳＭＣ＝１，２７４。各ケースで、再生心筋中の筋細胞の比率を、心筋ミオシン染色細胞で占められた面積を線引きし、梗塞領域により示される総面積で割り算して決定した。筋細胞増殖は、ＢｒｄＵおよびＫｉ６７によって測定した場合、内皮細胞よりもそれぞれ９３％（ｐ＜０．００１）および６０％（ｐ＜０．００１）高く、平滑筋細胞よりも２２５％（ｐ＜０．００１）および１７６％（ｐ＜０．００１）高かった。

【０１３５】

形成心筋における細胞の起源を、ＥＧＦＰの発現によって判定した（図７および図８）。ＥＧＦＰ発現は細胞質に限定され、Ｙ染色体は新規心臓細胞の核に限定された。ＥＧＦＰを、筋細胞、内皮細胞、および平滑筋細胞に特異的なタンパク質の標識と組合せた。それによって、各心臓細胞タイプを同定し、冠状血管内に組織された内皮細胞核および平滑筋細胞核を認識できる（図５、図７、および図８）。ＥＧＦＰを発現した新しい筋細胞、内皮細胞、および平滑筋細胞はそれぞれ５３±９％（ｎ＝７）、４４±６％（ｎ＝７）、および４９±７％（ｎ＝７）であった。これらの値は、ＥＧＦＰを発現した移植Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}骨髄細胞の画分４４±１０％（ｎ＝６）と一致した。ドナートランスジェニックマウスの心臓中で平均５４±８％（ｎ＝６）の筋細胞、内皮細胞、および平滑筋細胞がＥＧＦＰを発現した。

【０１３６】

Ｅ．Ｙ染色体の検出

蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）アッセイのため、７０％ホルムアルデヒドを含む変性溶液に断片を暴露した。エタノールで脱水した後、断片をＤＮＡプローブＣＥＰ　Ｙ（サテライトＩＩＩ）スペクトル緑（Ｖｙｓｉｓ）を用いて３時間ハイブリダイズした。核をＰＩで染色した。

心室の残存部分由来の細胞中にはＹ染色体は検出されなかった。しかしながら、新たに形成された筋細胞中にはＹ染色体が検出され、これは、それらの起源が注入骨髄細胞に由来するものであることを示す（図９）。

【０１３７】

Ｆ．転写因子およびコネキシン４３の検出

ウサギポリクローナル抗ＭＥＦ２（Ｃ－２１；Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、ウサギポリクローナル抗ＧＡＴＡ－４（Ｈ－１１２；Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、ウサギポリクローナル抗Ｃｓｘ／Ｎｋｘ２．５（Ｄｒ．Ｉｚｕｍｏから入手）、およびウサギポリクローナル抗コネキシン４３（Ｓｉｇｍａ）と一緒に断片をインキュベートした。ＦＩＴＣ結合ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ）を二次抗体として使用した。

新たに形成された筋細胞が、機能的コンピテンスを図る成熟細胞となったことを確認するため、筋細胞エンハンサ因子２（ＭＥＦ２）、心特異的転写因子ＧＡＴＡ－４，早期筋細胞発生マーカーＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５の発現を調査した。心臓において、ＭＥＦ２タン

パク質はＧＡＴＡ－４によって用いられ、ミオシン軽鎖、トロポニンＴ、α－ミオシン重鎖、心房性ナトリウム利尿因子、およびα－アクチンといった幾つかの心遺伝子のプロモータを相乗的に活性化する（Ｄｕｒｏｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７；Ｍｏｒｉｎｅｔ　ａｌ．，２０００）。Ｃｓｘ／Ｎｋｘ２．５は、筋細胞分化の初期段階に限定される転写因子である（Ｄｕｒｏｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）。再構成心臓において、心筋ミオシン標識細胞の全ての核がＭＥＦ２（図７Ａ～Ｆ）およびＧＡＴＡ－４（図１０）を発現したが、４０±９％のみがＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５を発現した（図７Ｇ～Ｉ）。これら筋細胞の性質を更に特性化するため、コネキシン４３の発現を判定した。このタンパク質は、筋細胞間に原形質膜を生成することで細胞間接続および電気的カップリングを担う（Ｂｅａｒｄｓｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８；Ｍｕｓｉｌ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）。細胞の細胞質中および密に整列する分化細胞の表面でコネキシン４３が明らかであった（図１１Ａ～Ｄ）。これらの結果は、心筋表現型の期待された機能コンピテンスと一致した。更に、種々の成熟段階にある筋細胞が、同じバンドおよび異なるバンドで検出された（図１２）。

【０１３８】

実施例２：梗塞心筋を修復するための骨髄細胞可動化

Ａ．心筋梗塞とサイトカイン

１５匹の２月齢雄Ｃ５７ＢＬ／６マウスを脾摘し、２週間後に、組換えラット幹細胞因子（ＳＣＦ）（２００μｇ／ｋｇ／日）および組換えヒト顆粒コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）（５０μｇ／ｋｇ／日）（Ａｍｇｅｎ）を１日１回、５日間にわたり皮下注射した（Ｂｏｄｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４；Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３）。エーテル麻酔下、左心室（ＬＶ）を露出させ、冠状動脈を結紮した（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９）。ＳＣＦおよびＧ－ＣＳＦを更に３日間与えた。脾摘し梗塞を惹起し生理食塩水を注入して疑似手術したマウス（ＳＯ）を対照とした。５０ｍｇ／ｋｇ体重のＢｒｄＵを１日１回、１３日間にわたり与えてから、解剖した。マウスは２７日後に解剖した。プロトコルはニューヨーク医科大学によって承認されたものであった。結果は平均±ＳＤで示される。有意性はスチューデントのｔ検定およびボンフェローニ法（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９）で判定した。対数順位検定によって致死率を計算した。Ｐ＜０．０５を有意とした。

【０１３９】

骨髄Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞の、心原性細胞系に分化転換し得る能力（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）を前提とし、死滅心筋領域にホーミングする可能性を高めるため、あるプロトコルを用いて末梢循環における該細胞の数を最大化した。正常動物では、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞の血中頻度は、骨髄中に存在する類似細胞の小画分でしかない（Ｂｏｄｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４；Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３）。前述したように、本明細書で用いられるサイトカイン処置は、骨髄中のＬｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞の著しい増加、およびかかる細胞の骨髄から末梢血への再分配を亢進する。このプロトコルで循環中のＬｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は２５０倍増加する（Ｂｏｄｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４；Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３）。

【０１４０】

現在の研究おいて、ＳＣＦおよびＧ－ＣＳＦによるＢＭＣ可動化は、梗塞マウスの生存率を劇的に増加させた。サイトカイン処置により７３％のマウス（１５匹中１１匹）が２７日間生存したが、未処置梗塞マウスにおいては致死率はかなり高かった（図１３Ａ）。この群の多数の動物が、心筋梗塞（ＭＩ）の３～６日後に死亡し、わずか１７％（５２匹中９匹）が２７日目まで達した（ｐ＜０．００１）。手術による外傷の影響を最小化するため、ＭＩ後４８時間以内に死亡したマウスは致死率曲線に含めなかった。左心房自由壁（ＬＶＦＷ）中の損失筋細胞数で測定したところ、２７日後において、サイトカイン注入動物（６４±１１％、ｎ＝１１）と生理食塩水注入動物（６２±９％、ｎ＝９）で梗塞サイズは同様であった（図１４）。

【０１４１】

重要なことは、手術の２７日後に解剖した１１匹のサイトカイン処置梗塞マウスの全てにおいて、骨髄細胞可動化によって心筋再生が亢進されたことである（図１３Ｂ）。梗塞内の心筋成長は、６日後（ｎ＝２）および９日後（ｎ＝２）に時期尚早に死亡した４匹のマウスにも見られた。心臓修復は、損傷領域の大半を占める、新たに形成された心筋バンドによって特徴付けられた。発生組織は梗塞領域の境界から内側に、そしてＬＶＦＷの心内膜から心外膜へと広がった。サイトカイン不在下では、心筋置換はまったく認められず、瘢痕形成を伴う治癒が明らかであった（図１３Ｃ）。反対に、処置マウスでは小さなコラーゲン蓄積領域が検出された。

【０１４２】

Ｂ．心エコー検査および血行動態によるＢＭＣ可動化検出

１３－ＭＨｚ線形トランスデューサ（１５Ｌ８）を備えたＳｅｑｕｏｉａ２５６ｃ（Ａｃｕｓｏｎ）を用いて覚醒マウスにおいて心エコー検査を実施した。前胸部を剪毛し、乳頭筋の位置で傍胸骨短軸から二次元（２Ｄ）画像およびＭモード追跡を記録した。Ｍモード追跡から、心臓拡張期および収縮期における解剖学的パラメータを得た（Ｐｏｌｌｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）。２Ｄ短軸視像におけるＬＶ断面積から駆出率（ＥＦ(ejection fraction)）を導いた（Ｐｏｌｌｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）：ＥＦ＝［（ＬＶＤＡ－ＬＶＳＡ）／ＬＶＤＡ］＊１００〔式中、ＬＶＤＡおよびＬＶＳＡは心臓拡張期および収縮期におけるＬＶ面積である〕。マウスを抱水クロラール（４００ｍｇ／ｋｇ体重、ｉｐ）で麻酔し、チャート式記録計に接続されたマイクロチップ圧力トランデューサ（ＳＰＲ－６７１、Ｍｉｌｌａｒ）をＬＶに侵入させ、非開胸処置において血圧と、＋およびｄＰ／ｄｔを評価した（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９）。

【０１４３】

ＥＦは、冠状動脈閉塞の９、１６、および２６日後において、非処置マウスよりも処置マウスでそれぞれ４８％、６２％、および１１４％高かった（図１５Ｄ）。サイトカインに暴露したマウスにおいては、壁の梗塞領域内で収縮機能が時間と共に発生した（図１５Ｅ～Ｍ；図１６Ｈ～Ｐ、ｗｗｗ．ｐｎａｓ．ｏｒｇ）。反対に、ＬＶ拡張終期圧（ＬＶＥＤＰ）は非処置マウスにおいて７６％上昇した。ＬＶ収縮期圧（図示なし）、発生圧力（ＬＶＤＰ）、＋およびｄＰ／ｄｔの変化も、サイトカイン処置の不在下でより大きかった（図１７Ａ～Ｄ）。更に、梗塞に隣接する領域および梗塞から離れた領域における心臓拡張ストレスの増加は、サイトカイン処置マウスにおいて６９～７３％少なかった（図１５Ｎ）。従って、サイトカイン介在梗塞修復により、再生心筋において注目に値するレベルの収縮が回復し、拡張期壁ストレスが低下し、心室性能が向上した。梗塞心臓のｉｎ　ｖｉｖｏ変化に際して、心筋再生により、腔拡張、壁厚減少が緩和された。

【０１４４】

心エコー検査によれば、ＬＶ収縮終期径（ＬＶＥＳＤ）および拡張終期径（ＬＶＥＤＤ）は、梗塞の９、１６、および２６日後において、サイトカイン処置マウスよりも非処置マウスで増加した（図１６Ａ～Ｂ）。心臓収縮期（ＡＷＳＴ）および拡張期（ＡＷＤＴ）前壁厚の評価は梗塞により妨げられた。測定可能な場合は、収縮期（ＰＷＳＴ）および拡張期（ＡＷＤＴ）の後壁厚は処置マウスにおいてより大きかった（図１６Ｃ～Ｄ）。解剖学的には、梗塞に隣接する壁および梗塞から離れた壁は、サイトカイン注入マウスにおいて２６％および２２％厚かった。ＢＭＣ誘導修復は、壁厚対腔半径比を４２％上昇させた（図１５Ａ）。更に。組織再生により、腔径（－１４％）、長軸（－５％）（図１６Ｆ～Ｇ）、および腔容積（－２６％）（図１５Ｂ）の増大が抑制された。重要なことは、処置動物において心室質量対腔容積比が３６％上昇したことであった。従って、新規集団をなす筋細胞および血管構造体の増殖および分化をもたらすＢＭＣ可動化は、心不全を規定する解剖学的変数を抑制した。

【０１４５】

Ｃ．心解剖学的構造および梗塞サイズの決定

血行動態測定に続き、腹大動脈にカニューレを挿入し、$CdCl_2$で心臓を心臓拡張で

停止させ、１０％ホルマリンで心筋を潅流した。ＬＶ腔(chamber)に、ｉｎ ｖｉｖｏで測定した拡張終期圧に等しい圧力で固定剤を充填した（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９７；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９９）。ＬＶ腔内軸を測定し、基部、中間部および頂部から得た３種の横断薄片をパラフィンに包埋した。中間部を用いてＬＶ厚、腔径、および容積を測定した（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９７；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９９）。ＬＶＦＷから失われた筋細胞の数によって梗塞サイズを決定した（Ｏｌｉｖｅｔｔｉ ｅｔ ａｌ．，１９９１；Ｂｅｌｔｒａｍｉ ｅｔ ａｌ．，１９９４）。

【０１４６】

心室質量に対する発生バンドの貢献を定量化するため、まず、各群のマウスにおいてＬＶＦＷ容積（重量を１．０６ｇ／ｍＬで割り算）を決定した。データは、疑似手術（ＳＯ）においては５６±２ｍｍ^3、梗塞未処置動物においては６２±４ｍｍ^3（生存ＦＷ＝４１±３；梗塞ＦＷ＝２１±４）、梗塞サイトカン処置マウスにおいては５６±９ｍｍ^3（生存ＦＷ＝３７±８；梗塞ＦＷ＝１９±５）であった。未処置動物とサイトカン処置動物における梗塞サイズを前提として、上記値を、２７日後の残余心筋および損失心筋の期待値と比較した。ＳＯにおけるＬＶＦＷ容積（５６ｍｍ^3）と未処置マウス（６２％）および処置マウス（６４％）における梗塞サイズから、冠状動脈梗塞の２７日後に、残存が見込まれる心筋容積（未処置＝２１ｍｍ^3；処置＝２０ｍｍ^3）および損失が見込まれる心筋容積（未処置＝３５ｍｍ^3；処置＝３６ｍｍ^3）を計算することができた（図１８Ａ）。新たに形成された心筋の容積をサイトカイン処置マウスのみで検出すると、１４ｍｍ^{3}であった（図１８Ａ）。即ち、修復バンドによって、梗塞サイズは６４％（３６ｍｍ^3／５６ｍｍ^3＝６４％）から３９％［（３６ｍｍ^3－１４ｍｍ^3）／５６ｍｍ^3＝３９％］に縮小した。２７日後のＬＶＦＷの残余部分は未処置マウスおよび処置マウスにおいて４１ｍｍ^{3}および３７ｍｍ^{3}であり（上記参照）、図１８ａに示すように、残存心筋はそれぞれ９５％（ｐ＜０．００１）および８５％（ｐ＜０．００１）肥大した。一貫して、筋細胞容積は９４％および７７％増加した（図１８Ｂ）。

【０１４７】

Ｄ．形成された心筋の総容積の決定

３種の断片の各々において、回復組織が占める面積および断片厚を測定することにより、再生心筋の容積を決定した。これら２つの変数の積から、各断片における組織修復量を出した。３種の断片の値を加算し、形成された心筋の総容積を得た。更に、心臓ごとに４００個の心筋の容積を測定した。断片をデスミンおよびラミニン抗体並びにヨウ化プロピジウム（ＰＩ）で染色した。核を中心に有し、縦方向を向いた細胞のみを含めた。各筋細胞の、核を通る長さと直径を収集し、円筒形と仮定して細胞容積を計算した（Ｏｌｉｖｅｔｔｉ ｅｔ ａｌ．，１９９１；Ｂｅｌｔｒａｍｉ ｅｔ ａｌ．，１９９４）。筋細胞を分類し、筋細胞クラス総容積と平均細胞容積の比から、各クラスの筋細胞数を計算した（Ｋａｊｓｔｕｒａ ｅｔ ａｌ．，１９９５；Ｒｅｉｓｓ ｅｔ ａｌ．，１９９６）。心筋単位面積当たりの細動脈および毛細血管プロファイルの数を前と同様に測定した（Ｏｌｉｖｅｔｔｉ ｅｔ ａｌ．，１９９１；Ｂｅｌｔｒａｍｉ ｅｔ ａｌ．，１９９４）。

【０１４８】

断片をＢｒｄＵまたはＫｉ６７抗体と一緒にインキュベートした。マウスモノクローナル抗心筋ミオシンを用いて筋細胞（Ｍ）を認識し、ウサギポリクローナル抗ＶＩＩＩ因子を用いて内皮細胞（ＥＣ）を認識し、マウスモノクローナル抗α－平滑筋アクチンミオシンを用いて平滑筋細胞（ＳＭＣ）を認識した。ＢｒｄＵおよびＫｉ６７で標識されたＭ、ＥＣ、およびＳＭＣ核の画分を共焦点顕微鏡検査によって得た（Ｏｒｌｉｃ ｅｔ ａｌ．，２００１）。１１匹のサイトカイン処置マウスにおいて核を抽出した；ＢｒｄＵ：Ｍ＝３，５４１；ＥＣ＝２，６０４；ＳＭＣ＝１，８２４、Ｋｉ６７：Ｍ＝３，０９６；ＥＣ＝２，４６５；ＳＭＣ＝１，４０４。

【０１４９】

細胞増殖の累積度を測定するために１４日目から２６日目にかけてＢｒｄＵを毎日注射

し、一方、解剖時の循環細胞数を決定するためにＫｉ６７を分析した。Ｋｉ６７は、Ｇ１、Ｓ、Ｇ２、前期および中期において細胞を同定し、後期および終期において減少する（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。ＢｒｄＵおよびＫｉ６７陽性筋細胞の比率はそれぞれＥＣよりも１．６倍および１．４倍高く、ＳＭＣよりも２．８倍および２．２倍高かった（図１８Ｃおよび図１９）。形成心筋は梗塞の７６±１１％を占めた；筋細胞は６１±１２％を構成し、新血管は１２±５％を構成し、その他が３±２％を構成した。バンドは１５×１０^{6}個の再生筋細胞を含み、これらの細胞は活発な成長期にあり、広いサイズ分布を有した（図１８Ｄ～Ｅ）。ＥＣおよびＳＭＳの成長の結果、新たな心筋１平方ｍｍ当たり１５±５個の細動脈と３４８±８２個の毛細血管が形成された。幾つかのＳＭＣ層を持ち管腔径１０～３０μｍの壁厚細動脈は、分化早期において血管を呈した。時に、定着過程における修復心筋内の冠状動脈分枝の不完全潅流が、赤血球を含む細動脈および毛細血管をもたらした（図１８Ｆ～Ｈ）。上記結果から、新たな血管は機能的にコンピテントであり、冠循環と接続していることが立証された。従って、組織修復により梗塞サイズは縮小し、筋細胞成長は血管形成を上回った。筋量置換は梗塞心臓の最も一般的な特徴である。

【０１５０】

Ｅ．細胞分化の判定

細胞質マーカーおよび核マーカーを使用した。筋細胞核：ウサギポリクローナルＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５、ＭＥＦ２、およびＧＡＴＡ４抗体（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７；Ｋａｓａｈａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）；細胞質：マウスモノクローナルネスチン（Ｋａｃｈｉｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）、ウサギポリクローナルデスミン（Ｈｅｒｍａｎｎ　ａｎｄ　Ａｅｂｉ；１９９８）、心筋ミオシン、マウスモノクローナルα－筋節アクチン、およびウサギポリクローナルコネキシン４３抗体（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。ＥＣ細胞質：マウスモノクローナルｆｌｋ－１、ＶＥ－カドヘリン、およびＶＩＩＩ因子抗体（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｙａｍａｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３；Ｂｒｅｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６）。ＳＭＣ細胞質：ｆｌｋ－１およびα－平滑筋アクチン抗体（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｃｏｕｐｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）。Ｉ型およびＩＩＩ型コラーゲン抗体の混合物によって瘢痕を検出した。

【０１５１】

５種の細胞質タンパク質を同定し、筋細胞の分化の状態を確認した（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｋａｃｈｉｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５；Ｈｅｒｍａｎｎ　ａｎｄ　Ａｅｂｉ,１９９８）：ネスチン、デスミン、α－筋節アクチン、心筋ミオシン、およびコネキシン４３。形成バンドに分散する個々の細胞においてネスチンが認められた（図２０Ａ）。これを例外とし、その他全ての筋細胞が、デスミン（図２０Ｂ）、α－筋節アクチン、心筋ミオシン、およびコネキシン４３（図２０Ｃ）を発現した。数種の心筋構造遺伝子のプロモータの活性化に関わる３種の転写因子を調査した（Ｏｒｌｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７；Ｋａｓａｈａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）：Ｃｓｘ／Ｎｋｘ２．５、ＧＡＴＡ－４、およびＭＥＦ２（図２１Ａ～Ｃ）。ｆｌｋ－１およびＶＥ－カドヘリンに対して陽性の単細胞（Ｙａｍａｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３；Ｂｒｅｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６）、２種のＥＣマーカー、が修復組織中に存在した（図２０Ｄおよび図２０Ｅ）。単離したまたは動脈壁内のＳＭＣ中でｆｌｋ－１が検出された（図２０Ｆ）。このチロシンキナーゼレセプターは血管形成時のＳＭＣの移動を亢進する（Ｃｏｕｐｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）。従って、梗塞心臓の修復には、ｄｅ　ｎｏｖｏ心筋をもたらす全ての心臓細胞集団の成長および分化が関与する。

【０１５２】

実施例３：成体マウス心臓における原始心臓細胞の移動

成体心室筋中に原始細胞集団が存在するか、およびかかる細胞が移動能を有するか判定するため、３種の主要増殖因子を化学誘引物質として使用した：肝細胞増殖因子（ＨＧＦ

）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および顆粒球単球コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）。ＳＣＦとＧＭ－ＣＳＦは、造血幹細胞の移行(translocate)を亢進することが示されているので選択した。ＨＧＦは造血幹細胞の移動を誘発するが、この増殖因子は、心臓発生早期において心臓細胞前駆体の有糸分裂、分化、および移動に深く関与する。これに基づき、マウス心臓から酵素作用により解離させた細胞を大きさによって分けた。心臓細胞を心臓組織から解離する方法は当業者には周知であり、過度の実験は必要ない（米国特許第６，２５５，２９２号参照。当該特許は参照によりその全部が本明細書に包含されるものとする）。直径５～７μｍで高い核対細胞質比を有する、小さな未分化細胞を含む均一な解離心臓細胞集団について、５μｍ細孔を含むゼラチン被覆フィルターを特徴とするＢｏｙｄｅｎマイクロチャンバにおいて移動アッセイを行った（Ｂｏｙｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９６２，Ｊ．Ｅｘｐｔｌ．Ｍｅｄ．１１５：４５３－４５６）。

【０１５３】

３種の増殖因子の存在下における移動細胞の用量－応答曲線に大きな差異は検出されなかった。しかしながら、ＨＧＦは、濃度１００ｎｇ／ｍＬで多数の細胞を可動化したと見られた。更に、ＨＧＦに対して走化反応を示した細胞は、１５％がｃ－ｋｉｔ陽性（ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}）細胞、５０％が多剤耐性－１（ＭＤＲ－１）標識細胞、および３０％が幹細胞抗原－１（Ｓｃａ－１）発現細胞からなった。可動化した細胞を１５％ウシ胎児血清中で培養すると、筋細胞、内皮細胞、平滑筋細胞および線維芽細胞に分化した。心筋ミオシン陽性筋細胞は標本の５０％を構成したが、ＶＩＩＩ因子標識細胞は１５％、α－平滑筋アクチン染色細胞は４％、およびビメンチン陽性ＶＩＩＩ因子陰性線維芽細胞は２０％含まれた。残りは小さな未分化細胞であり、これら４種の抗体で染色されなかった。結論として、マウス心臓は、増殖因子によって可動化される原始細胞を有する。ＨＧＦは、４種の心臓細胞系にｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化する細胞を移行する。

【０１５４】

実施例４：心臓ｃ－ｋｉｔ陽性細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖および新たな心筋のｉｎ　ｖｉｖｏ生成

原始ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞が老齢Ｆｉｓｃｈｅｒ３４４ラットに存在するか判定するため、解離した心臓細胞を、ｃ－ｋｉｔレセプター抗体（ＡＣＫ－４－ビオチン、抗ｃ－ｋｉｔｍＡｂ）で被覆した磁気ビーズに暴露した。分離後、これら小さな未分化細胞を１０％ウシ胎児血清中で培養した。数日間で細胞は付着し、一週間で増殖を開始した。７～１０日で集密に達した。継代Ｐ２およびＰ４で達成された倍加時間はそれぞれ３０時間および４０時間であった。老齢期に達することなく、細胞はＰ１８（第９０代）まで成長した。複製能力はＫｉ６７によって立証された。Ｐ２において、８８±１４％の細胞が核中にＫｉ６７タンパク質を含んだ。Ｐ１とＰ４の間に追加の測定値を得た。細胞の４０％がα－筋節アクチンまたは心筋ミオシンを、１３％がデスミンを、３％がα－平滑筋アクチンを、１５％がＶＩＩＩ因子またはＣＤ３１を、１８％がネスチンを発現した。上記ｉｎ　ｖｉｔｒｏ条件下で、細胞には、サルコメアが適正に整列した明らかな筋原線維組織は見られなかったし、自発的な収縮も認められなかった。同様に、ＡｎｇＩＩ、ノルエピネフリン、イソプロテレノール、機械的伸長および電界刺激でも、収縮機能を開始することはできなかった。これに基づき、筋原性の平滑筋細胞系および内皮細胞系に関わる上記細胞がそれらの生物学的特性を永久に失ったか、或いはそれらの役割がｉｎ　ｖｉｖｏで再建されるか評価することにした。Ｐ２における細胞のＢｒｄＵ標識に続き、冠状動脈閉塞の３～５時間後に、梗塞Ｆｉｓｃｈｅｒ３４４ラットの損傷領域にＢｒｄＵ陽性細胞を注射した。２週間後、動物を解剖し、梗塞領域の特性を調査した。核のＢｒｄＵ標識と共に、長軸に沿って平行に並んだ筋原線維を含む筋細胞が認められた。更に、細動脈および毛細血管プロファイルを含む血管構造体が存在し、ＢｒｄＵに対して陽性を示した。結論として、原始ｃ－ｋｉｔ陽性細胞は老齢心臓に存在し、損傷を受け機能低下した心筋に移植された場合、増殖し、実質細胞および冠状血管へ分化する能力を維持している。

【０１５５】

実施例５：若年および老年ラット心臓における心臓幹細胞介在筋細胞複製

心臓は分裂終了臓器ではなく、生理学的には細胞分裂して死滅細胞を置換する筋細胞亜集団を含む。筋細胞増殖は病理学的過負荷に際して増強され、筋量を増大し、心臓の性能を維持する。しかしながら、複製筋細胞の起源は依然として同定されていない。故に、Ｆｉｓｃｈｅｒ３４４ラットの心筋において幹細胞／前駆細胞の特性を持つ原始細胞を探索した。若年および老年の動物を試験して、幹細胞および分裂筋細胞のサイズ集団に加齢が影響を及ぼすか判定した。４月齢のラットにおけるｃ－ｋｉｔ陽性細胞およびＭＤＲＩ陽性細胞の数はそれぞれ１１±３および１８±６／１００ｍｍ^{2}組織であった。２７月齢のラットにおける値は３５±１０および４２±１３／１００ｍｍ^{2}組織であった。新たに生成された小筋細胞が多数同定され、それらはやはりｃ－ｋｉｔ陽性またはＭＤＲＩ陽性であった。循環細胞の核内で発現されるＫｉ６７タンパク質は４月齢および２７月齢においてそれぞれ筋細胞の１．３±０．３％および４．１±１．５％で検出された。６回または５６回の注射後のＢｒｄＵ局在化は、４月齢において１．０±０．４％および４．４±１．２％、２７月齢において４．０±１．５％および１６±４％であった。組織片中で測定した有糸分裂指数から、有糸分裂中の筋細胞核の画分は４月齢および２７月齢においてそれぞれ８２±２８／１０^{6}および４８５±９８／１０^{6}からなることが分かった。上記判定は、細胞有糸分裂指数を得るための解離筋細胞において確認された。この方法により、多核筋細胞の全ての核が同時に有糸分裂期にあったことを立証することが可能となった。この情報は、組織片では得られなかった。収集された値は、４月齢で９５±３１／１０^{6}の筋細胞が、２７月齢で６２０±９８／１０^{6}の筋細胞が分裂中であったことを示した。両月齢区間において、紡錘体、収縮環の形成、核膜の分解、核分裂、及細胞質分裂が明らかになった。結論として、原始未分化細胞は成体心臓に存在し、加齢に伴う増加は、細胞周期に入り核分裂および細胞質分裂を起こす筋細胞数の増加と並行する。この関係は、老化心臓における筋細胞成長のレベルおよび運命を心臓幹細胞が規制し得ることを示している。

【０１５６】

実施例６：ヒト心臓のキメラ現象および幹細胞の役割

損傷心臓の再構築において常在原始細胞が果たす重要な役割は、雌性心臓を雄性レシピエントに移植したときの臓器キメラ現象を考えるとき、十分に理解される。このために、雄性ホストに移植された雌性心臓８個を分析した。グラフトされた雌性心臓への雄性細胞の移行を、Ｙ染色体のＦＩＳＨによって同定した（実施例１Ｅ参照）。この方法により、Ｙ染色体で標識された筋細胞、冠状細動脈、毛細血管プロファイルの比率はそれぞれ９％、１４％、および７％であった。同時に、移植された雌性心臓中の未分化ｃ－ｋｉｔ陽性細胞および多剤耐性－１（ＭＤＲ１）陽性細胞の数を測定した。更に、これらの細胞がＹ染色体を含む可能性を確認した。心臓移植では、レシピエントの心房の一部を保存し、そこにドナー心臓をその心房の一部で取付ける。この外科処置は、ホストおよびドナーに由来する心房が、移植心臓の複雑な再構築過程に貢献する未分化細胞を含むか理解するために重要である。定量的には、ｃ－ｋｉｔ標識細胞およびＭＤＲ１標識細胞の値は対照非移植心臓では極めて低く、左心室心筋１００ｍｍ^{2}当たりｃ－ｋｉｔが３、ＭＤＲ１が５であった。反対に、レシピエントの心房におけるｃ－ｋｉｔ細胞およびＭＤＲ１細胞の数は１５および４２／１００ｍｍ^{2}であった。ドナーの心房における対応する値は１５および５２／１００ｍｍ^{2}であり、心室においては１１および２１／１００ｍｍ^{2}であった。移植は、心臓における原始未分化細胞の著しい増加を特徴とした。ホストの心房中の幹細胞はＹ染色体を含み、ドナーの心房および心室においては平均５５％および６３％のｃ－ｋｉｔ細胞およびＭＤＲ１細胞がＹ染色体を呈した。ｃ－ｋｉｔ陽性細胞およびＭＤＲ１陽性細胞の全てがＣＤ４５に対して陰性を示した。これらの知見は、移植心臓への雄性細胞の移行はドナー心筋の再構成に大きな影響を及ぼすことを示している。結論として、幹細胞は成体心臓に広範に分布しており、それらの柔軟性および移動性のために、高度の分化によって筋細胞、冠状細動脈および毛細血管構造体を生成する。

【０１５７】

実施例７：成体マウス心臓における幹細胞の同定および局在化

正常心臓においては筋細胞のターンオーバーが起こり、心筋損傷は、筋細胞増殖および血管成長の活性化をもたらす。このような適応性は、多能性原始細胞が心臓に存在し、死滅筋細胞の生理学的置換や、損傷後の細胞成長応答に関与する可能性を惹起する。これに基づき、正常マウス心臓における未分化細胞の存在を、幹細胞因子のレセプターであるｃ－ｋｉｔ、細胞色素、毒性物質、薬物を排出する能力のあるＰ－糖タンパク質である多剤耐性－１（ＭＤＲ１）、および細胞シグナリングおよび細胞付着に関与する幹細胞抗原－１（Ｓｃａ－１）を含む表面マーカーを用いて判定した。左右心房と、心室の基部、中間部、および頂部からなる４つの別個の領域を分析した。ｃ－ｋｉｔ陽性細胞数は、高い方から順に、心房、心室の頂部、基部、中間部においてそれぞれ２６±１１、１５±５、１０±７、６±３／１００ｍｍ^{2}であった。基部および中間部と比較すると、心房と頂部におけるｃ－ｋｉｔ陽性細胞の大きな画分は統計的に有意である。ＭＤＲ１陽性細胞数はｃ－ｋｉｔを発現するものより大きかったが、同様の局在化パターンを示し、心房、頂部、基部、および中間部において４３±１４、２９±１６、１４±７、および１２±１０／１００ｍｍ^{2}であった。やはり、心房および頂部における値が他の２つの部位よりも高かった。Ｓｃａ－１標識細胞は最も高い値を示し、心房において１５０±３６／１００ｍｍ^{2}個の陽性細胞が認められた。ｃ－ｋｉｔ、ＭＤＲ１、およびＳｃａ－１に対して陽性の細胞は、ＣＤ４５に対して、並びに、筋細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、および線維芽細胞の細胞質タンパク質に対して陰性を示した。更に、ｃ－ｋｉｔおよびＭＤＲ１の両方に対して陽性の細胞数を測定し、２種の幹細胞マーカーを有する細胞を確認した。心臓全体で、３６％のｃ－ｋｉｔ標識細胞がＭＤＲ１を発現し、１９％のＭＤＲ１細胞がｃ－ｋｉｔも有した。結論として、幹細胞はマウス心臓全体に分布しているが、心房および頂部といった低ストレスの領域に蓄積する傾向にある。

【０１５８】

実施例８：常在心臓幹細胞による梗塞心筋の修復

移動、侵入、および発現アッセイ

ＨＧＦレポーターであるｃ－Ｍｅｔは、造血幹細胞および肝幹細胞において同定されているが（１２６，９０）、最も重要には星状骨格筋細胞（９２）および胎児心筋細胞（１２７）において同定されている。この知見により、著者は、ｃ－ＭｅｔがＣＳＣ中に存在するか、そのリガンドＨＧＦがかかる未分化細胞に生物学的影響を及ぼすか判定することにした。ＨＧＦはｉｎ　ｖｉｔｒｏでＣＳＣの移動および侵入を亢進し、ｉｎ　ｖｉｖｏで貯蔵領域から梗塞心筋部位への移行を助成するという仮説を設けた。ＨＧＦは、マトリックスメタロプロテイナーゼ－２（９４、９５）の発現と活性化を通して細胞移動に影響する（１２８）。この酵素族は細胞外マトリックス中の障壁を破壊することができ、ＣＳＣの移動、ホーミング、および組織回復を容易にする。

【０１５９】

ＩＧＦ－１は、有糸分裂誘発性および抗アポトーシス性であり、神経幹細胞の増殖および分化に必要である（９６、９７、９８）。ＣＳＣがＩＧＦ－１Ｒを発現するならば、ＩＧＦ－１は、ＣＳＣが損傷心筋へ移動するときにそれらの生存可能性を保護することに同様に影響し得る。ＩＧＦ－１過剰発現は、成体マウス心臓における筋細胞増殖を特徴とし（６５）、この細胞成長形態はＣＳＣ活性化、分化および生存に依存する。

本試験の最初の部分で、移動および侵入アッセイを実施し、走化性ＨＧＦの存在下でのｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の可動性を確認した。

【０１６０】

心臓細胞を酵素作用により解離し、筋細胞を除去した（１２４）。小細胞を無血清培地（ＳＦＭ）中に懸濁させた。上方ウェルおよび下方ウェルを有する改変Ｂｏｙｄｅｎチャンバを用いて細胞移動を測定した（Ｎｅｕｒｏ　Ｐｒｏｂｅ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）。４８ウェルプレート用フィルタは、直径５μｍの細孔を有するゼラチン被覆ポリカーボネート膜からなった。０．１％ＢＳＡおよび漸増濃度のＨＧＦを含むＳＭＦを下方ウェルに充填した。５０μＬの小細胞懸濁液を上方ウェルで平板培養した。５時間後、フィルタを４％パラホルムアルデヒド中に４０分間固定し、ＰＩ、ｃ－ｋｉｔ、およびＭ

ＤＲ１抗体で染色した。ＦＩＴＣ結合抗ＩｇＧを二次抗体として使用した。各ＨＧＦ濃度で６種の別個の実験を行った。各アッセイにおいて、各ウェル内の無作為に選択した４０個の領域をカウントし、用量－応答曲線を作成した（図６１）。小細胞に及ぼすＩＧＦ－１の運動作用（ｍｏｔｏｇｅｎｉｃ　ｅｆｆｅｃｔ）は、ＩＧＦ－１単独のまたはＨＧＦと組合せた移動アッセイ（データは示さない）を実施することにより除外した。２４ウェルおよび１２種の細胞培養インサートを備えたチャンバ（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ、Ｔｅｍｅｃｕｌａ、ＣＡ）を使用して侵入アッセイを実施した。増殖因子欠乏細胞外マトリックスをインサート表面に薄く広げた。反対に、１００ｎｇ／ｍＬのＨＧＦを下方チャンバにおいて平板培養した。侵入細胞は皮膜を消化し、ポリカーボネート膜の底部に付着した。４８時間後、移動アッセイで記載したのと同じプロトコルで移行した細胞の数を測定した。４種の別個の実験を実施した（図６２）。移動アッセイで得られた結果と一致し、ＩＧＦ－１は細胞侵入に何ら影響しなかった（データは示さない）。

【０１６１】

両細胞種で移動は類似しており、１００ｎｇ／ｍＬ　ＨＧＦでピークに達した。５時間後、下方チャンバに移動したｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の数はそれぞれ対照細胞の３倍および２倍の多さであった。ＨＧＦ濃度が高くとも細胞移動は向上しなかった（図６１および図６２）。これに基づき、１００ｎｇ／ｍＬのＨＧＦを使用して、ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の、侵入チャンバの合成細胞外マトリックスを貫通する能力を判定した。４８時間後、増殖因子により、チャンバの下部におけるｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の数はそれぞれ８倍および４倍に増加した。ＩＧＦ－１は、２５～４００ｎｇ／ｍＬの濃度で上記ＣＳＣの移動性に影響を及ぼさなかった。ＩＧＦ－１をＨＧＦに添加しても、ＨＧＦ単独で得られるｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の移動性および侵入性に変化はなかった。

【０１６２】

小さな未分化ｃ－Ｍｅｔ^{POS}細胞を免疫磁気ビーズを用いて回収し、かかる細胞の、ゼラチンを貫通する能力をザイモグラフィによって評価した（図６３）。手短に言えば、小細胞を心臓（ｎ＝４）から単離し、ｃ－Ｍｅｔ抗体で被覆したマイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）によって分離した。細胞を１００ｎｇ／ｍＬのＨＧＦに３７℃で３０分間暴露した。細胞溶解物を０．１％ゼラチンと共重合した１０％ポリアクリルアミドゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）にかけた。ゲルを、クーマシブルー染色液（０．５％）中でインキュベートし、ゼラチン溶解活性領域を、灰色背景に対する透明バンドとして検出した。これを行って、ｃ－Ｍｅｔ^{POS}細胞がマトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）を発現し、ゲル中に存在する基質を消化できるか明らかにした（９４、９５）。肯定的な結果が得られ（図６３）、かかる原始細胞の移動性が、少なくとも一部は、ＭＭＰの活性化によるものであることが示された。合わせて、かかるｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイは、ＣＳＣにおけるＨＧＦの走化機能を示している。このＨＧＦの役割は、ｃ－Ｍｅｔレセプターへの結合と、それに続くＭＭＰ合成の刺激によって仲介されると見られる（９４、９５）。

【０１６３】

マウスにおける心筋梗塞

マウスにおいて心筋梗塞を惹起し、５時間後、ＨＧＦおよびＩＧＦ－１を含む液を、心房から境界域にかけて４箇所に注射した。ＨＧＦは漸増濃度で投与し、貯蔵ＣＳＣと死滅組織間で走化性勾配を作出した。このプロトコルは、損傷領域へのＣＳＣのホーミングを増進し、新しい心筋を生成するよう導入された。もしそうであったならば、動物死に関連する大規模梗塞は速やかに縮小し、梗塞サイズの限界および生存が本発明によって拡大される。

【０１６４】

１２９匹の雌ＳＶ－ＥＶマウスを使用した。麻酔（ケタミン１５０ｍｇ－アセプロマジン１ｍｇ／ｋｇ体重、ｉ．ｍ．）のあと、マウスを人工呼吸させ、心臓を露出させ、左冠状動脈を結紮した（６１、８７）。増殖因子で処置される動物における冠状動脈結紮は、

大規模の梗塞を惹起するよう大動脈に出来るだけ近付けて行った。次いで、閉胸し、動物を覚醒させた。５時間後、マウスを麻酔し、開胸し、各２．５μＬのＨＧＦ－ＩＧＦ－１を心房から梗塞に隣接する領域にかけて４箇所に注射した。最後の２つの注射は境界域の両側に行った。ＨＧＦの濃度は梗塞の方向で、５０から１００および２００ｎｇ／ｍＬに漸増させた。ＩＧＦ－１は２００ｎｇ／ｍＬの一定濃度で投与した。６日目から１６日目までマウスにＢｒｄＵ（５０ｍｇ／ｋｇ体重）を注射し、この期間に、新たに形成された小さな心筋の増殖を同定した。疑似手術マウスおよび梗塞未処置マウスには標準生理食塩水を同じく４箇所に注射した。

【０１６５】

臓器修復に及ぼすＣＳＣの影響を議論する前に、ｃ－ｋｉｔおよびＭＤＲ１を発現する細胞におけるｃ－ＭｅｔおよびＩＧＦ－ＩＲの存在を、対照マウスの心房および左心室（ＬＶ）で測定した。同一の分析を、冠状動脈閉塞マウスの心房、梗塞ＬＶ、および非梗塞ＬＶで行った。これは、増殖因子投与の２～３時間後、つまり冠状動脈閉塞の７～８時間後に実施した。（目的は、原始細胞は死滅細胞および周辺の生存心筋に侵入すること、およびＨＧＦおよびＩＧＦ－１が該プロセスに関与することを明らかにすることである。

【０１６６】

正常心臓（ｎ＝５）、梗塞処置心臓（ｎ＝６）、および梗塞未処置心臓（ｎ＝５）の領域に分散するｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞においてｃ－ＭｅｔおよびＩＧＦ－１Ｒが検出された（図２２Ａ～Ｆ）。ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の大画分がｃ－ＭｅｔおよびＩＧＦ－１Ｒを単独でまたは一緒に発現した。心筋梗塞および増殖因子の投与は、心筋内にｃ－ＭｅｔおよびＩＧＦ－１Ｒがあってもなくても一貫して、ＣＳＣの相対的比率を変化させることはなかった（図６４）。核（循環細胞）内のヘアピン１（アポトーシス）およびヘアピン２（壊死）標識およびＫｉ６７発現を使用し、損傷心臓および非損傷心臓の種々の部位におけるｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の生存可能性および活性化をそれぞれ確認した（図２２Ｇ～Ｌ）。

【０１６７】

ＣＳＣは、対照マウスにおいては、心室より心房により多く存在した。急性心筋梗塞および増殖因子投与は心臓内の原始細胞の数と分布を著しく変化させた。生存ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞は、境界域および遠隔組織の残余心筋においても、梗塞領域の死滅心筋においても有意に増加した。重要なことは、ＣＳＣは心房で減少したことであり（図２２Ｍおよび図２２Ｎ）、この貯蔵部位から、ストレスを受けた生存心筋および死滅心筋に原始細胞が移行したことを示唆している。梗塞未処置マウスでは別の現象が認められた。即ち、生存ＣＳＣは心室よりも心房に残存していた。対照および梗塞処置マウスにおいては、梗塞心筋および周辺心筋内のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞においてアポトーシスおよび壊死は検出されなかった。境界域および梗塞内に分布する未分化細胞のそれぞれ約３５％および２０％においてＫｉ６７標識が同定された（図６５）。梗塞未処置マウスにおいては、梗塞内のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の大半がアポトーシスであった（図２２Ｍおよび図２２Ｎ）。壊死は見られなかった。梗塞から遠隔心筋および心房組織までアポトーシスＣＳＣ死滅勾配が認められた。かかるマウスにおいて、生存ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の僅か１０～１４％がＫｉ６７を発現したに過ぎない（図６５）。

【０１６８】

即ち、上記結果は、ＣＳＣがｃ－ＭｅｔおよびＩＧＦ－１Ｒを発現し、それによってＨＧＦおよびＩＧＦ－１が梗塞心臓におけるＣＳＣのコロニー形成、増殖、および生存に肯定的な影響を及ぼすことを支持するものである。ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏデータによれば、ＨＧＦは細胞移動において、ＩＧＦ－１は細胞分裂および生存可能性において有力な役割を持つものと見られる。しかしながら、梗塞未処置マウスにおいては、ＣＳＣは梗塞領域に移行せず、既存の原始細胞はアポトーシスによって死滅する。重要な疑問は、梗塞内に位置するＣＳＣが種々の心臓細胞系に分化し、死滅心筋を再構成し得るかである。肯定的な知見が得られれば、梗塞処置マウスにおける心修復の機序、梗塞未処

置マウスにおける心筋再生の欠如の潜在的な説明が得られるであろう。

【０１６９】

解剖学的測定のため、ＣｄＣｌ^{2}で心臓を拡張期で停止させ、心筋を１０％ホルマリンで潅流した。ｉｎ ｖｉｖｏで測定された拡張終期圧に等しい圧力でＬＶ腔に固定剤を充填した。ＬＶ腔内軸を決定し、中間部を使ってＬＶ厚および室径を得た。心室間隔膜を含むＬＶから失われた筋細胞の数によって梗塞サイズを測定した（８７）。

【０１７０】

心筋梗塞の１６日後、未処置マウスおよびＨＧＦ－ＩＧＦ－１処置マウスの左心室および隔膜においてそれぞれ４２％（ｎ＝１５）および６７％（ｎ＝２２）の筋細胞が失われた（図２３Ａ）。梗塞が６０％大きいにも関わらず、増殖因子に暴露されたマウスは心機能をより保存した（図１２Ｂ）。ＨＧＦ－ＩＧＦ－１は、ＬＶ拡張終期圧の上昇および＋ｄＰ／ｄｔおよびｄＰ／ｄｔの減少を抑える結果となった。梗塞サイズの差は致死率に影響せず、これは２つのマウス群で同様であり、未処置群においては４３％、処置群においては４０％であった。重要なことは、増殖因子を得た２２匹中１４匹のマウスが、ＬＶの６０％以上に及ぶ梗塞を生き延びたことである。これらのうち７匹にはＬＶの７５％から８６％に及ぶ梗塞があった。未処置マウスの梗塞は６０％を超えなかった（図２３Ｃおよび図２３Ｄ）。注射したマウスとは異なり、ＬＶ壁の後側の一部と心室間隔膜全体は、未処置動物が生存するためには保存されねばならなかった。６０％を超える梗塞は、マウス、ラット、イヌ、その他の哺乳動物種の生命と相容れない。４６％梗塞を持つヒトにおいては、不可逆的心原性ショックおよび死が併発する（９９）。

【０１７１】

疑似手術マウスのＬＶ容積並びに未処置および処置動物の梗塞サイズから、冠状動脈梗塞の１６日後に生存および損失するであろう心筋容積を計算することが可能であった。筋細胞、血管構造体、その他の組織成分を含む新たに形成された心筋の容積を、増殖因子処置マウスにおいてのみ検出したところ、８ｍｍ^{3}であった。即ち、修復バンドは梗塞サイズを６７％から５７％に縮小した（図６８および図６９）。

【０１７２】

ＨＧＦ－ＩＧＦ－１の走化性および有糸分裂誘発性は、新しい心筋を製造する壁の梗塞領域において原始細胞の可動化、増殖、および分化をもたらした。小動物におけるこの方法論的アプローチの複雑性にも関わらず、８５％のケースで梗塞内の心筋バンドの形成が得られた（２６匹中２２匹のマウス）。バンドは損傷領域の６４±８％を占め、壁の内層および外層から等距離の梗塞の中間部に位置した。極めて大型の梗塞においては、壁の全圧が発生心筋によって置換された（図２３Ｅ～Ｈ）。

【０１７３】

解剖学的には、長軸および腔径は２群の梗塞マウスで同様であり、治療的介在が積極的な心室再構築を亢進したことを示している。このことは、処置マウスにおける６０％大型の梗塞サイズと一致する。更に、壁厚対腔半径の比は未処置マウスより処置マウスで低下が少なかった。この関係は、処置マウスにおいてＬＶ拡張終期圧の低下がより少ないことと合わせて、当群における拡張期壁ストレスの増加を有意に緩和した（図６７）。

【０１７４】

原始細胞をモノクローナルｃ－ｋｉｔおよびＭＤＲ１抗体で標識した（８２、８３）。ＢｒｄＵ抗体によってＢｒｄＵ取込みを検出した（６１、８７）。抗ＶＩＩＩ因子を用いて内皮細胞を、抗α－平滑筋アクチンを用いて平滑筋が認識された。筋細胞分化については、ネスチン、デスミン、心筋ミオシン、α－筋節アクチン、Ｎ－カドヘリン、およびコネキシン４３抗体を使用した。梗塞内の瘢痕形成は、抗Ｉ型およびＩＩＩ型コラーゲンの混合物によって検出した（８３、６１、８７）。

【０１７５】

形態計測解析によって、修復心筋の組成を評価した。実質細胞および血管プロファイルの認識に、筋細胞、内皮細胞、および平滑筋に特異的な抗体を使用した（６１、８７）。更に、細胞のＢｒｄＵ標識を経時的な再生組織のマーカーとして使用した。筋細胞がバン

ドの８４±３％を、冠状脈管系が１２±３％を、その他の構成成分が４±１％を占めた。新たな筋細胞は６００～７，２００μｍ^{3}の範囲で変動し、平均容積は２，２００±４００μｍ^{3}であった（図６８および図６９）。合わせて、３．１±１．１百万個の筋細胞が形成され、２．４±０．８百万個の細胞の損失を補充した。この僅かに過剰な細胞再生は、筋細胞サイズの相違にあった。疑似手術心臓においては、筋細胞容積は１８，０００±３，６００μｍ^{3}であり、これは成長細胞の８．２倍に当たる。重要なことは、筋量損失の１６％が梗塞の１６日後に再構成されたことである（損失筋量：１８，０００×２．４×１０^6＝４３ｍｍ^3；再生筋量：２．２００×３．１×１０^6＝７．０ｍｍ^3；７．０：４３＝１６％）。新たな筋細胞はまだ成熟中であるが、ｉｎ　ｖｉｖｏでは心エコー検査により、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでは機械的検査で示されたように、機能的にコンピテントであった。

【０１７６】

１３－ＭＨｚ線形トランスデューサを備えたＡｃｕｓｏｎ　Ｓｅｑｕｏｉａ　２５６ｃを使用し、覚醒マウスにおいて心エコー検査を実施した（８７）。乳頭筋の位置で傍胸骨短軸から二次元（２Ｄ）画像およびＭモード追跡を記録した。２Ｄ短軸視像においてＬＶ断面積から駆出率（ＥＦ）を導出した。ＥＦ＝［（ＬＶＤＡ－ＬＶＳＡ）／ＬＶＤＡ］×１００〔式中、ＬＶＤＡおよびＬＶＳＡは心臓拡張期および収縮期におけるＬＶ面積である〕。血行動態測定には、マウスを麻酔し、チャート式記録計に接続されたＭｉｌｌｅｒマイクロチップ圧力トランデューサをＬＶに侵入させ、非開胸処置において圧力と、＋およびｄＰ／ｄｔを評価した。１５日後に実施した心エコー検査は、処置された梗塞壁の再生部分において収縮作用が一部回復されたことを示した。駆出率も、未処置マウスよりも処置マウスの方が高かった（図２４Ａ～Ｅ）。即ち、構造的修復は機能的修復を伴った。

【０１７７】

新たな筋細胞が機能的コンピテンスに達し、心室性能の改善に貢献したことを確認するため、かかる細胞を、壁の梗塞領域の再生心筋を酵素作用により解離し（１２９）、収縮作用をｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した（１２４、１３０）。梗塞処置マウス（ｎ＝１０）からコラゲナーゼ消化によって単離した筋細胞を、１．０ｍＭのＣａ$^{2+}$を含む細胞浴（３０±０．２℃）に入れ、心臓拡張閾値の２倍の強度を持つ０．５Ｈｚの方形脱分極パルスによって３～５ミリ秒間刺激した。コンピュータに記憶させたビデオ画像からパラメータを取得した（１２４、１３０）。発生筋細胞は筋細胞膜下領域内の細胞の周囲に筋原繊維を持つ小さい細胞であった。新たな筋細胞は、ＤＮＡを活発に複製する新生児細胞に類似していた。それらは、残余の肥大心室筋細胞より著しく小さかった（図２５ＡおよびＢ）。残存した旧筋細胞と比較し、成長中の細胞は、ピーク短縮および短縮速度が高く、ピーク短縮時間は小さかった（図２５Ｃ～Ｊ）。

【０１７８】

単離した新たな筋細胞をＫｉ６７で染色し、かかる細胞が循環性であるか、従ってＤＮＡを合成するか判定した。梗塞処置マウスから単離した残存肥大筋細胞に理想的なプロトコルを適用した。これに基づき、単核細胞および二核細胞における各筋細胞核のＤＮＡの中身をＰＩ染色および共焦点顕微鏡検査によって評価した（図２５ＡおよびＢ）。対照の２倍体マウスリンパ球をベースラインとして使用した。目的は、細胞系への関与の前にＣＳＣ中で細胞融合が起こるか確認することである。この可能性は最近ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験で示されている（１３１、１３２）。非循環性の新たな筋細胞と、肥大した残余細胞は２倍体核のみを有し、かかる現象が心修復において役割を担うことを除外した（図６６）。

【０１７９】

バンド内の成熟中の筋細胞の分化の程度を確認するため、ネスチン、デスミン、心筋ミオシン重鎖、α－筋節アクチン、Ｎ－カドヘリン、およびコネキシン４３の発現を評価した。Ｎ－カドヘリンは筋膜付着を同定し、コネキシン４３は介在板内の細隙結合を同定する。これらのタンパク質は発生上調節される。コネキシン４３は、筋細胞の電気的結合および同調性にも重要である。上記６種のタンパク質は、実質的に全ての新たに形成された

筋細胞中で検出された（図２６Ａ～Ｎ）。ＢｒｄＵによって標識された筋細胞の比率は８４±９％であり、再生組織において細胞増殖が進行中であることを示した。心修復には、毛細血管および細動脈の形成が含まれる（図２７Ａ～Ｄ）。管腔内の赤血球の存在は、血管が冠状循環系に接続されていることを示した。しかしながら、この段階の心筋回復は、毛細血管構造よりは抵抗細動脈の優勢な成長を特徴とした。新たな心筋１ｍｍ^{2}当たり５９±２９個の細動脈および１３７±８０個の毛細血管が存在した。

【０１８０】

現在の知見は、常在ＣＳＣはその貯蔵域から可動化され、梗塞心筋においてコロニー形成し、そこで心臓細胞系に分化し、組織再生をもたらすことを示す。ここで使われた措置は、通常は動物の命と両立しないサイズの梗塞を持つ動物を救うことができた。

【０１８１】

実施例９：心臓幹細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化およびｉｎ　ｖｉｖｏ機能的コンピテンス取得

Ａ．細胞の回収とクローニング

２０～２５月齢雌Ｆｉｓｃｈｅｒラットから心臓細胞を単離した（１１１、１１２）。無傷の細胞を分離し、筋細胞を除去した。小細胞を懸濁させ、凝集体をろ過器で除去した。細胞を、膜の外面に局在するＮ端エピトープを認識するウサギｃ－ｋｉｔ抗体（Ｈ－３００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）と一緒にインキュベートした。細胞を、抗ウサギＩｇＧ（Ｄｙｎａｌ）およびｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞で被覆した磁気ビーズに暴露し、磁石を使って回収した（ｎ＝１３）。ＦＡＣＳ（ｎ＝４）については、細胞をｒ－フィコエリトリン結合ラットモノクローナル抗ｃ－ｋｉｔ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）で染色した。両方法において、ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は小細胞集団の６～９％の範囲とした。

【０１８２】

ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は、筋細胞（α－筋節アクチン、心筋ミオシン、デスミン、α－心筋アクチニン、コネキシン４３）、内皮細胞（ＥＣ；ＶＩＩＩ因子、ＣＤ３１、ビメンチン）、平滑筋（ＳＭＣ；α－平滑筋アクチン、デスミン）、および線維芽細胞（Ｆ；ビメンチン）細胞質タンパク質に対して陰性を示した。筋細胞系の核マーカー（Ｎｋｘ２．５、ＭＥＦ２、ＧＡＴＡ－４）は細胞の７～１０％において、細胞質タンパク質は細胞の１～２％において、検出された。ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は骨格筋転写因子（ＭｙｏＤ、ミオゲニン、Ｍｙｆ５）、即ち骨髄、リンパ、および赤血球細胞系のマーカー（ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ８、ＴＥＲ－１１９）を発現せず、細胞はＬｉｎ$^-$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞であったことを示した。

【０１８３】

ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を、神経幹細胞の選択および成長に使った１～２×１０^{4}細胞／ｍＬ　ＮＳＣＭで平板培養した（１２２）。これは、ダルベッコのＭＥＭおよびハムのＦ１２（比１：１）、ｂＦＧＦ、１０ｎｇ／ｍＬ、ＥＧＦ，２０ｎｇ／ｍＬ、ＨＥＰＥＳ、５ｍＭ、インシュリン－トランスフェリン－セレナイトで構成された。ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は２週間で付着し、増殖を開始した（図２８ａ，ｂ）。次いで、ＮＳＣＭを分化培地（ＤＭ）で置換し、７～１０日間で集密に達した。細胞をトリプシン処理することで継代した。Ｋｉ６７発現によって判定される循環細胞は、各代（Ｐ）Ｐ１～Ｐ５（各Ｐにおいてｎ＝５）で７４±１２％から８４±８％の範囲で変化した。Ｐ２およびＰ４における倍加時間は平均４１時間であった。成長停止または老齢期に達することなく、細胞はＰ２３まで分裂し続け、その時点で凍結した。心臓細胞系はＰ０からＰ２３まで同定された。Ｐ０（ｎ＝７）、Ｐ３（ｎ＝１０）、Ｐ１０（ｎ＝１３）、およびＰ２３（ｎ＝１３）において、筋細胞は２９～４０％、ＥＣは２０～２６％、ＳＭＣは１８～２３％、およびＦは９～１６％であった。液体窒素中での６ヵ月後に成長させたＰ２３のアリコートは親細胞と同じ表現型を発現した。

【０１８４】

ＤＭ中で成長させたＰ０およびＰ１において、細胞の５０％がＮｋｘ２．５を、６０％がＭＥＦ２を、３０％がＧＡＴＡ－４を、および５５％がＧＡＴＡ－５を示した（図２８

ｃ～ｆ）。反対に、骨格筋（ＭｙｏＤ、ミオゲニン、Ｍｙｆ５）、血液細胞（ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ８、ＴＥＲ－１１９）、および神経細胞（ＭＡＰ１ｂ、神経フィラメント２００、ＧＦＡＰ）マーカーは同定されなかった。

【０１８５】

クローニングのため、細胞を１０～５０細胞／ｍＬ　ＮＳＣＭで播種した（図２８ｇ）（１０９、１１０）。一週間後、単一の細胞に由来するコロニーを認識した（図２８ｈ）。フィブロネクチン、Ｉ型コラーゲン、ビメンチンは不在であり、線維芽系が除外された。個々のコロニーをクローニングシリンダーにより分離し、平板培養した。複数のクローンが発生し、各調製物において１つのクローンを選択し、特性分析した。１０％ＦＣＳおよび$１０^{－８}$Ｍデキサメタゾンを含むＭＥＭを用いて分化を誘発した（ＤＭ）。サブクローニングのため、複数クローン由来の細胞を１０～５０細胞／ｍＬ　ＮＳＣＭで平板培養した。単一のサブクローンを単離し、ＤＭ中で平板培養した。各サブクローニングステップで、細胞アリコートを懸濁液中で成長させ、クローン球を発生させた。

【０１８６】

各クローンは２～３群の$Ｌｉｎ^{－}ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}$細胞を複数群含み（図２９ａ）、これら細胞の大半（～２０－５０）は$ｃ－ｋｉｔ^{ＮＥＧ}$細胞のなかに散在した。一部の細胞はＫｉ６７陽性であり、有糸分裂期にあるものもあった（図２９ｂ－ｄ）。心筋ミオシンおよびα－筋節アクチンを発現する筋細胞、ＶＩＩＩ因子、ＣＤ３１，およびビメンチンを発現するＥＣ、α－平滑筋アクチンを発現するＳＭＣ、ビメンチンのみを発現するＦが各クローンで同定された（図２９ｅ－ｈ）。ネスチンを含む小細胞の凝集体も存在した（補足情報）。即ち、心筋から単離された$Ｌｉｎ^{－}ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}$細胞は幹細胞に期待される特性を有した。それらは、クローン原性、自己再生性、多能性を備え、主要心臓細胞種の起源となる。数種の一次クローンをサブクローン分析し、一次クローンの表現型の安定性が確認された：クローン原性、自己再生性、多能性。ほとんどのクローンの表現型は一次クローンのものと区別されなかった。しかしながら、８種のサブクローンのうち２種において、一方では筋細胞のみが得られ、他方ではＥＣのみが同定された。

【０１８７】

Ｃｏｒｎｉｎｇ未処理皿内の懸濁液中で成長させたクローン原性細胞は球状クローンを生成した（図３０ａ）。この固定剤非依存増殖は幹細胞に典型的である[１４，１５]。球状体は$ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}$および$ｃ－ｋｉｔ^{ＮＥＧ}$細胞のクラスターと大量のネスチンで構成されていた（図３０ｂ－ｄ）。他の幹細胞と同様に[１４，１５]、ＤＭ中で平板培養すると、球状体は容易に付着し、細胞は球状体の外に移動し、分化した（図３０ｅ－ｈ）。

【０１８８】

細胞を４％パラホルムアルデヒド中に固定し、未分化細胞をｃ－ｋｉｔ抗体で標識した。筋細胞用マーカーはＮｋｘ２．５、ＭＥＦ２、ＧＡＴＡ－４、ＧＡＴＡ－５、ネスチン、α－筋節アクチン、α－心筋アクチニン、デスミン、および心筋ミオシン重鎖などであった。ＳＭＣ用マーカーは、α－平滑筋アクチンおよびデスミン、ＥＣ用はＶＩＩＩ型因子、ＣＤ３１、ビメンチン、Ｆ用はＶＩＩＩ因子不在下のビメンチン、フィブロネクチン、およびＩ型プロコラーゲンで構成した。ＭｙｏＤ、ミオゲニン、およびＭｙｆ５を骨格筋細胞マーカーとして使用した。ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ８、およびＴＥＲ－１１９を使用して造血細胞系を除外した。ＭＡＰ１ｂ、神経フィラメント２００、ＧＦＡＰを使用して神経細胞系を認識した。ＢｒｄＵおよびＫｉ６７を使用して循環細胞を同定した（６１、８７）。核をＰＩで染色した。

【０１８９】

筋細胞およびＳＭＣはｉｎ　ｖｉｔｒｏで収縮しなかった。アンギオテンシンＩＩ、イソプロテレノール、ノルエピネフリン、および電気刺激でも収縮は亢進されなかった。ＥＣは、ｅＮＯＳといった完全分化マーカーを発現しなかった。

【０１９０】

Ｂ．心筋梗塞および細胞移植

ＢｒｄＵ標識細胞（Ｐ２；陽性細胞＝８８±６％）を移植した。２月齢の雌Ｆｉｓｃｈ

ｅｒラットに心筋梗塞を惹起した（１１１）。５時間後、２２匹のラットに２×１０^{5}個の細胞を、梗塞の両側の隣接領域に注射した。１０日後に１２匹を解剖し、２０日後に１０匹を解剖した。各期間に、８～９匹の梗塞ラットと１０匹の疑似手術ラットに生理食塩水を注射し、５匹にＬｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞を注射し、対照とした。ケタミン麻酔下、２０日後に解剖したラットには、９日後と１９日後に心エコー検査を実施した。Ｍモード追跡から、ＬＶ拡張終末期の直径と壁厚を得た。駆出率を計算した（８７）。１０日後と２０日後に動物を麻酔し、非開胸処置においてＬＶ圧、＋およびｄＰ／ｄｔを評価した（１１１）。致死率は低かったが、術後１０日目および２０日目において、未処置ラットよりも処置ラットで統計的な有意性はなく、全群合わせて平均３５％であった。プロトコルは施設内治験審査委員会によって承認されたものであった。

【０１９１】

Ｃ．解剖学的および機能的結果

心臓を拡張期に停止させ、ホリマリンで固定した。左心室から失われた筋細胞画分によって（８７）、梗塞サイズは、１０日後には処置ラットおよび未処置ラットにおいて５３±７％および４９±１０％（ＮＳ）、２０日後には処置ラットおよび未処置ラットにおいて７０±９％および５５±１０％（Ｐ＜０．００１）とそれぞれ決定された（８７）。各心臓において４００個の新たな筋細胞の容積を測定した。断片をデスミンおよびラミニンおよびＰＩで染色した。核が中央に位置し縦方向に向いた筋細胞において、核を通る細胞長および細胞径を収集して細胞容積を計算した（８７）。

【０１９２】

断片をＢｒｄＵおよびＫｉ６７抗体と一緒にインキュベートした。１０日後の１２個の処置梗塞のうち９つで、２０日後の１０個の処置梗塞の全てで、バンド状をなす再生心筋が同定された。１０日後では、バンドは細くて不連続であったが、２０日後では、より太く、梗塞領域を通して存在した（図３１ａ－ｃ）。筋細胞（Ｍ）、ＥＣ、ＳＭＣ、およびＦは、心筋ミオシン、ＶＩＩＩ因子、α－平滑筋アクチン、およびＶＩＩＩ因子不在下でのビメンチンによってそれぞれ同定された。筋細胞は、心筋ミオシン抗体およびヨウ化プロピジウム（ＰＩ）でも同定された。１０日後および２０日後でそれぞれ３０ｍｍ^{3}および４８ｍｍ^{3}の新たな筋細胞が測定された。組織再生により、梗塞サイズは、１０日後では５３±７％から４０±５％に（Ｐ＜０．００１）、２０日後では７０±９％から４８±７％に（Ｐ＜０．００１）縮小した。

【０１９３】

ＢｒｄＵおよびＫｉ６７で標識された細胞は共焦点顕微鏡検査で同定された（１０３、１０５）。ＢｒｄＵ標識のために抽出した核数は：Ｍ＝５，２２９；ＥＣ＝３，５７２；ＳＭＣ＝４，０１０；Ｆ＝５，５２９であった。同じくＫｉ６７については：Ｍ＝９，２９０；ＥＣ＝９，１０３；ＳＭＣ＝８，３９２であった。筋細胞分化は、心筋ミオシン、α－筋節アクチン、α－心筋アクニチン、Ｎ－カドヘリン、およびコネキシン４３を用いて証明された。コラーゲンはＩ型およびＩＩＩ型コラーゲン抗体によって検出された。

【０１９４】

移植細胞をＢｒｄＵによって標識したので、発生心筋内の細胞の起源はこのマーカーによって同定された。筋細胞、細動脈（図３１ｆ－ｎ）、および毛細血管プロファイルを検出した。１０日後では、２０日後よりも筋細胞、毛細血管、および細動脈の比率は低く、コラーゲンは高かった。Ｋｉ６７による細胞成長評価は１０日後で優れており、２０日後で低下した（補足情報）。

【０１９５】

心筋ミオシン、α－筋節アクチン、α－心筋アクニチン、Ｎ－カドヘリン、およびコネキシン４３が筋細胞において検出された（図３１ｍ－ｔ；補足情報）。１０日後では、筋細胞は小さく、筋節はほとんど検出されず、Ｎ－カドヘリンおよびコネキシン４３は大半が細胞質中に存在していた（図３１ｍ、ｎ、ｑ、ｒ）。筋細胞容積は平均して１，５００μｍ^{3}であり、１３．９×１０^{6}個の筋細胞が形成された。２０日後では、筋細胞は密集し、筋原線維はより豊富であった。Ｎ－カドヘリンおよびコネキシン４３が筋膜付着およ

び介在板のネクサスを規定した（図３１ｏ、ｐ、ｓ、ｔ）。筋細胞容積は平均して３，４００μｍ^{3}であり、１３×１０^{6}個の筋細胞が存在した。

【０１９６】

単一塩基が突出したヘアピン型オリゴヌクレオチドプローブのｉｎ　ｓｉｔｕ連結よって筋細胞アポトーシスを測定した。アポトーシスに対して抽出された核の数は１０日後で３０，４６４、２０日後で１２，７６０であった。１０日後から２０日後の筋細胞数の保存は、Ｋｉ６７標識における減少、およびアポトーシスにおける増加と一致した（０．３３±０．２３％から０．８５±０．３１％、Ｐ＜０．００１）。即ち、最初は筋細胞増殖が優勢であり、後には筋細胞肥大が優勢となった。１０日後から２０日後までで血管数はほぼ倍増した。

【０１９７】

新たな筋細胞の機械的特性を判定する方法は既に記載されている[30]。梗塞処置マウス（ｎ＝４）から単離した筋細胞を、１．０ｍＭのCa^{2+}を含む細胞浴（３０±０．２℃）内で平板培養し、心臓拡張期閾値の２倍の強度を持つ０．５Ｈｚの方形脱分極パルスによって３～５ミリ秒間刺激した。コンピュータに記憶させたビデオ画像から機械的パラメータを取得した。２０日後に、処置された心臓の梗塞領域および非梗塞領域から単離した筋細胞の機械的挙動を測定した（図３２ａ－ｅ）。新細胞はカルシウム許容性があり、刺激に応答した。しかしながら、残余筋細胞と比較すると、成熟中の細胞は、ピーク短縮および短縮速度が低く、ピーク短縮までの時間および５０％再伸長までの時間は、２群の細胞で同様であった（図３２ａ－ｌ）。発生筋細胞の筋原線維はほとんど周囲に分布し、筋節線紋が明らかであった（図３２ａ－ｅ）。

【０１９８】

細胞移植により梗塞サイズおよび腔拡張は低下し、壁厚および駆出率は増加した。梗塞心室壁に再現された収縮と拡張終期圧、発生圧力、並びに＋およびｄＰ／ｄｔは２０日後で向上した。拡張期ストレスは処置ラットにおいて５２％低かった（補足情報）。即ち、心修復によって亢進された構造的および機能的改変により、拡張期負荷が低下し、心室性能が改善した。梗塞サイズはラットの２つの群で同様であったにも関わらず、この有益な効果が得られた。

【０１９９】

移植細胞のコロニー形成、複製、および分化、並びに組織再生にはｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞と損傷心筋が必要であった。疑似手術ラットに注入されたｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞はグラフトが不十分であり、分化しなかった。梗塞の境界へのｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞の注入は心修復に効果がなかった。

【０２００】

本明細書で報告されるＬｉｎ$^-$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞の多能性表現型は、筋細胞、ＳＭＣ、およびＥＣは各々別個の系に由来するとするニワトリ（１１３）、ゼブラフィッシュ（１１４）、および哺乳動物（１１５）における心臓細胞系決定と明らかな対照をなすものである。しかしながら、全ての研究が一致しているわけではない（１１６）。上記実験（１１３、１１４、１１５、１１６）は、本明細書におけるように、マークされた細胞のうち任意のものの発生可能性を扱っている訳ではないので、異なる結果は、正常な発生上の行方と発生上の可能性の相違の別の例を示すものかもしれない。更に、損傷心筋を修復する手段としての、ヒト胎児幹細胞（１１７）、内皮前駆細胞（１０１）、クローン原性細胞（５２）の柔軟性が最近報告されている（１０１、５２）。

【０２０１】

実施例１０：増殖因子プロモーターによる心臓幹細胞（ＣＳＣ）の可動化
覚醒イヌにおける局部的および全体的心機能を向上する梗塞心筋の修復

下記のごとき例外はあるが、上述の非限定的な実施例の方法を使用した。

げっ歯類における幹細胞のホーミングおよび分化による梗塞後の心筋再生は、大動物において同様の心修復が起こるかの疑問には答えていない。更に、新たな心筋は、梗塞部分の機能異常に作用して収縮を回復するのかも未知である。この目的で、血行動態および局

部的壁機能の測定のため、イヌに慢性的に計器を取り付けた。拍出量およびＥＦも測定した。左前下行冠状動脈の付近で水圧オクルダーを膨張させることにより心筋梗塞を誘導した。４時間後、ＨＧＦおよびＩＧＦ－１を境界域に注射し、幹細胞を可動化および活性化した。その後、イヌを最長３０日間モニタした。増殖因子により慢性心修復が惹起され、梗塞の膨張を後進させた。セグメント短縮は－２．０±０．７％から＋５．５±２．２％に、拍出力は－１８±１１から＋５３±１０ｍｍ×ｍｍＨｇに、拍出量は２２±２から４５±４ｍＬに、駆出率は３９±３から６４±４％に上昇した。梗塞の８時間後の処置イヌにおいては、原始細胞数がベースラインの２４０±４０ｃ－ｋｉｔ陽性細胞から１７００±４００（遠隔心筋）、４４００±１２００（境界域）、および３１００±９００ｃ－ｋｉｔ陽性細胞／１００ｍｍ^2（梗塞領域）に増加した。Ｋｉ６７標識は、遠隔、境界、および梗塞心筋においてそれぞれ４８％、４６％、および２６％のｃ－ｋｉｔ陽性細胞において検出された。即ち、これらの細胞は高度に複製している。このような効果は、梗塞未処置イヌにおいては実質的になかった。急性実験を、冠状動脈閉塞の１０～３０日後に移植結晶によって規定される梗塞心筋の定量分析で補足した。新たな心筋における奇異性運動から正常収縮への変化は、大きさが４００から１６，０００、平均容積２，０００±６４０μｍ^{3}の筋細胞の生成によって特性化された。ＢｒｄＵ標識された内皮および平滑筋細胞を伴う抵抗血管は８７±４８／ｍｍ^{2}組織であった。毛細血管は細動脈の２～３倍であった。合わせて、梗塞の１６±９％が健康な心筋によって置換された。即ち、イヌ科常在原始細胞は、貯蔵部位から可動化され、死滅心筋に到達し得る。幹細胞の活性化および分化により梗塞心臓の修復が亢進され、局地的な壁運動および全身的な血行動態が向上する。

【０２０２】

実施例１１：常在心臓幹細胞の可動化が、梗塞心臓におけるアンギオテンシンＩＩ閉塞に対する重要な追加治療を構成する

下記のごとき例外はあるが、上述の非限定的な実施例の方法を使用した。

心筋梗塞（ＭＩ）の主要悪化因子の２つは筋量損失と腔拡張であり、いずれもネガティブな左心室（ＬＶ）再構築と心性能の低下の原因となる。これらのＭＩの悪影響を阻止しようと、常在心臓幹細胞（ＣＳＣ）を可動化および活性化して組織再生を亢進し、ＡＴ$_1$レセプター遮断剤ロサルタン（Ｌｏｓ）を２０ｍｇ／ｋｇ体重／日の用量で投与して細胞肥大を緩和し、それによって腔容積の増加を抑制した。これに基づき、マウスにおいてＭＩを惹起し、動物を４群に再分類した：１．疑似手術（ＳＯ）；２．ＭＩのみ；３．ＭＩ－Ｌｏｓ；４．Ｍｉ－Ｌｏｓ－ＣＳＣ。ＭＩの一ヵ月後、動物を解剖し、ＬＶ機能、梗塞寸法、心再構築を評価した。ＣＳＣ処置マウスにおいては心筋再生も測定した。ＬＶが失った筋細胞の数に基づく梗塞サイズはＭＩで４７％、ＭＩ－Ｌｏｓで５１％、Ｍｉ－Ｌｏｓ－ＣＳＣで５３％であった。ＭＩおよびＭＩ－Ｌｏｓと比較し、ＬｏｓおよびＣＳＣで処置したＭＩでは、損傷心臓の結果は次の点において好ましいものであった；腔径：ＭＩに対して－１７％およびＭＩ－Ｌｏｓに対して－１２％；長軸：ＭＩに対して－２６％（ｐ＜０．００１）およびＭＩ－Ｌｏｓに対して－８％（ｐ＜０．００２）；および腔容積：ＭＩに対して－４０％（ｐ＜０．０１）およびＭＩ－Ｌｏｓに対して－３５％（ｐ＜０．０４）。ＬＶ量対腔容積の比は、ＭＩおよびＭＩ－ＬｏｓよりもＭＩ－Ｌｏｓ－ＣＳＣにおいてそれぞれ４７％（ｐ＜０．０１）および５６％（ｐ＜０．０１）高かった。ＭＩ－Ｌｏｓ－ＣＳＣにおける組織修復は１０×１０^{6}個、９００μｍ^{3}の新たな筋細胞で構成された。更に、このマウス群では心筋１ｍｍ^{2}当たり７０の細動脈と２００の毛細血管が存在した。９ｍｍ^{3}の新たな心筋が生成され、ＭＩサイズは２２％減少し、ＬＶの５３％から４１％となった。心エコー検査によれば、ＭＩ－Ｌｏｓ－ＣＳＣマウスの壁の梗塞領域において収縮機能が再現された。血流動態検査によれば、ＭＩ－Ｌｏｓ－ＣＳＣマウスはＬＶＥＤＰが低く、＋およびｄＰ／ｄｔが高かった。結論として、心室再構築に及ぼすロサルタンの好影響は、梗塞領域へのＣＳＣ移行に媒介される心修復過程によって増強される。可動化したＣＳＣは梗塞サイズおよび心室拡張を低減し、それによって梗塞心臓の収縮作用を更に改善する。

【０２０３】

実施例１２：肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）がｃ－ｍｅｔの核への移行を誘発し、ＧＡＴＡ－４の発現および心臓幹細胞（ＣＳＣ）分化を活性化する

下記のごとき例外はあるが、上述の非限定的な実施例の方法を使用した。

予備試験において、著者らは、ｃ－ｋｉｔまたはＭＤＲ－１に対して陽性を示すＣＳＣが表面レセプターｃ－ｍｅｔを発現することを記録できた。ｃ－ｍｅｔはＨＧＦのレセプターであり、リガンド結合がマトリックスメタロプロテイナーゼの合成を介して細胞運動性を亢進した。しかしながら、ｃ－ｍｅｔ活性化がＣＳＣの生態および機能に更なる影響があるかは知られていない。この目的で、ＮＳＣＭにおいて５０ｎｇ／ｍＬのＨＧＦに暴露されたＣＳＣ上のｃ－ｍｅｔが、増殖因子に細胞内内在化および移行によって応答するか試験した。驚くべきことに、原始的特性を維持した被刺激細胞においてｃ－ｍｅｔの核内局在化が共焦点顕微鏡検査によって検出された。ＨＧＦがｃ－ｍｅｔに及ぼすこの異例の影響により、可動化されたレセプターが他の核内タンパク質と反応してＣＳＣの細胞成長および分化に関与し得る可能性が生じた。細胞系の関与における心特異的転写因子ＧＡＴＡ－４の重要な役割の故に、免疫沈降およびウエスタンブロット法により、ｃ－ｍｅｔおよびＧＡＴＡ－４によって作成されたタンパク質複合体を同定した。単一ＨＧＦ刺激に続く時間依存性分析により、ｃ－ｍｅｔ－ＧＡＴＡ－４複合体は１５分から３日目まで漸増したことが分かった。時間は、筋細胞その他の心臓細胞への原始細胞の分化と対をなした。ＧＡＴＡ－４とｃ－ｍｅｔのＤＮＡレベルでの分子相互作用を確認するため、ＨＧＦで刺激した細胞から単離した核抽出物にゲルシフト法を１時間実施した。ＧＡＴＡ配列を含むプローブを用い、シフトしたバンドが得られた。しかしながら、ＧＡＴＡ－４抗体の追加により、極度にシフトしたバンドが得られた。反対に、ｃ－ｍｅｔ抗体の包含により、ＧＡＴＡバンドの光学密度は減衰した。ＴＡＴＡボックス上流のＧＡＴＡ配列はｃ－ｍｅｔプロモーターにおいて同定されたので、第二移動性シフトアッセイを実施した。今度は、ＨＧＦ刺激細胞由来の核抽出物は、ｃ－ｍｅｔ抗体によって軽減されたバンドシフトをもたらした。反対に、ＧＡＴＡ－４抗体は極度にシフトしたバンドを誘発した。即ち、核レベルでのＨＧＦ介在ｃ－ｍｅｔ移行は、ｃ－ｍｅｔに転写因子機能を授与することであり得、更に試験すれば、このＤＮＡ結合がＧＡＴＡ－４発現を増強し、未成熟心臓細胞の分化をもたらすか示されるであろう。

【０２０４】

実施例１３：ヒト心臓幹細胞の単離と発現、およびそれに有効な培地の調製

作業室内無菌下で心筋組織（平均重量１ｇ以下）を採取した。

４２５～４５０ｍＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（Ｃａｍｂｒｅｘ　１２－７１９Ｆ）、５～１０％の患者血清（心耳組織と共に得られた、１００～１５０ｍＬの患者血液に由来する５０～７５ｍＬの血清）、２０ｎｇ／ｍＬのヒト組換えｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　１００－１８Ｂ）、２０ｎｇ／ｍＬのヒト組換えＥＧＦ（Ｓｉｇｍａ　Ｅ９６４４）、５μｇ／ｍＬのインシュリン（ＲａｙＢｉｏｔｅｃｈ　ＩＰ－０１－２７０）、５μｇ／ｍＬのトランスフェリン（ＲａｙＢｉｏｔｅｃｈ　ＩＰ－０３－３６３）、５ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ　Ｓ５２６１）、１．２２ｍｇ／ｍＬのウリジン（Ｓｉｇｍａ　Ｕ－３００３）、および１．３４ｍｇ／ｍＬのイノシン（Ｓｉｇｍａ　Ｉ－１０２４）を使って成長培地を調製した。

【０２０５】

成長培地を充填した無菌ペトリ皿内に組織を浸漬し、無菌下で小片に切断した（２００～４００ｍｇ）。各組織片を、１ｍＬの凍結培地（凍結培地は、成長培地とＤＭＳＯの容積比９：１の混合物、例えば９ｍＬの培地と１ｍＬのＤＭＳＯの混合物からなった）を含む１．２ｍＬ低温保存バイアルに移入した。

低温保存バイアルを、－７０℃から－８０℃に予冷したナルゲン容器内で凍結させ、－７０℃から－８０℃で最低３日間保存した。

【０２０６】

３７℃に加温された水槽内の７０％エタノール蒸留水溶液を含む容器に浸漬して、試料

を（３７℃で）解凍した。２分後、バイアルをフード下に置き、開封した。ピペットにより上澄みを除去し、室温に保たれた標準生理食塩水で置換した。次いで、試料を１００ｍｍペトリ皿に移し、生理食塩水で２回洗浄した。Ｓｔｅｒｉ２５０（Ｉｎｏｔｅｃｈ）で滅菌したピンセットを使用して心標本から線維組織と脂肪を手作業で分離した。次いで、試料を成長培地に移し、１～２ｍｍ^{2}の薄片を作成した。

【０２０７】

薄片を、上述のごとく５～１０％ヒト血清で富養化した成長培地を含む素皿内でカバースライド下に平板培養した。ペトリ皿を５％ＣＯ$_2$下３７℃でインキュベートした。

組織播種から１～２週間後、ＣＳＣの成長は明らかであった。細胞増殖の全期間にわたり、週２回、成長培地を交換した。培地は４℃で保存し、使用前に３７℃で加温した。合計８ｍＬの培地を１００ｍｍペトリ皿に使用した。培養片、即ち細胞によって生成された調整培地を保存するため、一回に培地を６ｍＬだけ取出し、６ｍＬの新鮮な培地を追加した。

【０２０８】

更に２週間後、～５，０００個の心筋細胞クラスターが各組織フラグメントを包囲することが期待された。

集密前に、成長培地を除去し、一皿当たり４ｍＬのトリプシン（０．２５％）［Ｃａｒｎｂｒｅｘカタログ番号１０１７０；無視し得る量の内毒素］を用い５～７分かけて細胞を分離させた。６ｍＬの血清含有培地を用いて反応を停止させた。

【０２０９】

次いで、Ｍｙｌｔｅｎｙｉ免疫磁気ビーズを使用して細胞を分類(sort)し、ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞を得た。細胞分類は、抗ｃ－ｋｉｔＨ３００（ｓｃ－５５３５　Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）を一次抗体として、マイクロビーズと結合した抗ウサギを二次抗体（１３００４８６０２　Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）として使用し、間接法によって実施した。心筋試料から成長した細胞を１５ｍＬファルコンチューブに入れ、８５０ｇ、４℃で１０分間遠心分離した。培地を除去し、細胞を１０ｍＬ　ＰＢＳ中に再懸濁させた。細胞を再度、洗浄の目的で、８５０ｇ、４℃で１０分間遠心分離した。ＰＢＳを除去し、細胞ペレットを９７５μＬ　ＰＢＳ中に再懸濁させてから、１．５ｍＬ試験管に移した。２５μＬの抗ｃ－ｋｉｔ抗体（２５μｇの抗体に相当）Ｈ－３００（ｓｃ－５５３５　Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）を添加した。３６０度回転シェーカー中のバイアルにて、抗体と一緒に４℃で１時間インキュベートした。

【０２１０】

インキュベーション後、細胞を８５０ｇ、４℃で１０分間遠心分離し、１ｍＬ　ＰＢＳ中に再懸濁させ、再度遠心分離した。次いで、細胞を、免疫ビーズに結合させた二次抗体（８０μＬのＰＢＳおよび２０μＬの抗体）と一緒に４℃で４５分間インキュベートし、この間に、シェーカー内のバイアルは１８０度回転させた。インキュベーション後、４００μＬのＰＢＳを添加し、細胞懸濁液を分離カラムに通して磁気分類した（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３００４２２０１）。ｃ－ｋｉｔ陽性細胞はカラムに付着し、それを回収し、１．５ｍＬ試験管に入れた。細胞を遠心分離し、１ｍＬの予め加温（３７℃）した培地に再懸濁させ、２４ウェルプレートにおいて平板培養した。

【０２１１】

次いで、ｃ－ｋｉｔ＋細胞を成長培地中で平板培養し、増殖させた。３～４ヵ月後（±１ヶ月）、約百万個の細胞が得られた。細胞増殖の全期間にわたり、週２回成長培地を交換した。培地は４℃で保存し、使用前に３７℃で加温した。合計１ｍＬの培地を２４ウェルの各々に使用した。所望の数の注射用細胞を得るため、細胞を未集密で３回継代培養した：１）３５ｍｍペトリ皿に２ｍＬの培地を充填；２）６０ｍｍペトリ皿に４ｍＬの培地を充填；および、３）１００ｍｍペトリ皿に８ｍＬの培地を充填。培養細胞によって生成された調整培地を保存するため、各継代で、２／３の培地のみを交換した。

【０２１２】

ｃ－ｋｉｔに対する抗体および心臓細胞系関与のマーカー（即ち、心筋細胞、内皮細胞

、平滑筋細胞）に対する抗体、例えば（ａ）転写因子、例えばＧＡＴＡ４、ＭＥＦ２Ｃ、Ｅｔｓ１、およびＧＡＴＡ６、並びに（ｂ）その他の抗原、例えばａ－筋節アクチン、トロポニンＩ、ＭＨＣ、コネキシン４３、Ｎ－カドヘリン、フォン・ヴィレブランド因子、平滑筋アクチンを使用し、免疫細胞化学法およびＦＡＣＳによってｃ－ｋｉｔ＋細胞（ＣＳＣ）の特性を分析した。所望であれば、その他のマーカーおよび／またはｆｌｉｋ－１などのエピトープに対して細胞を分析することもできる。

ＣＳＣを活性化するため、ＣＳＣを、２００ｎｇ／ｍＬの肝細胞増殖因子および２００ｎｇ／ｍＬのインシュリン様増殖因子－１を更に含む成長培地と一緒に２時間インキュベートした。

【０２１３】

実施例１４：ヒト心臓幹細胞の単離と増殖、および心筋梗塞治療における使用

上述したように心臓手術を受けた患者５１人から同意のもとに不要な心筋標本を入手した。試料を細断し、肝細胞増殖因子およびインシュリン様増殖因子－１をそれぞれ２００ｎｇ／ｍＬおよび２００ｎｇ／ｍＬの濃度で補充した培地を含むコーティングしていないペトリ皿の表面に播種した。２９ケースで細胞の成長に成功した。このサブセットにおいて、播種の～４日後に細胞成長が明らかとなり、～２週間後、クラスターをなす～５，０００から７，０００個の細胞が各組織片を包囲した（図７０Ａ～Ｃ）。組織由来の細胞成長を免疫ビーズを用いてｃ－ｋｉｔに対して分類し、培養した（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｌｉｎｋｅ，２００５）。上述のごとく細胞表現型をＦＡＣＳおよび免疫細胞化学法によって定義した（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｏｒｌｉｃ，２００１，Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５）。分類したｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を固定し、心臓、骨格筋、神経、造血の各細胞系のマーカーに対して試験し（下記表１）、Ｌｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅ（Ｌｉｎ$^{-}$）－ｈＣＳＣを検出した（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｌｉｎｋｅ，２００５；Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５）。Ｐ０における心筋試料由来の細胞成長画分は細胞抗原ｃ－ｋｉｔ、ＭＤＲ１、およびＳｃａ－１－様を発現した（図７０Ｄ～Ｆ）、これらはそれぞれ細胞集団全体の１．８±１．７、０．５±０．７、１．３±１．９％を構成した。これらの細胞は、ＣＤ１３３、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ８、ＣＤ２０、およびグリコホリンＡを含む造血細胞マーカーに対して陰性を示した（下記表１）。

【０２１４】

【表１】
表１．Ｌｉｎｅａｇｅ－ｎｅｇａｔｉｖｅ（Ｌｉｎ⁻）ＣＳＣ及び早期関与細胞（ＥＣＣ）の同定

マーカー	Ｌｉｎ－ＣＳＣ	ＥＣＣ	標識
造血細胞系			
ＧＡＴＡ１§	不在	不在	直接
ＧＡＴＡ２§	不在	不在	直接
ＣＤ４５＊	不在	不在	直接
ＣＤ４５ＲＯ＊	不在	不在	直接
ＣＤ８＊	不在	不在	直接
ＣＤ２０＊	不在	不在	直接
グリコホリンＡ＊	不在	不在	直接
骨格筋細胞系			
ＭｙｏＤ§	不在	不在	直接
ミオゲニン§	不在	不在	直接
Ｍｙｆ５§	不在	不在	直接
骨格筋ミオシン†	不在	不在	直接
神経細胞系			
神経フィラメント２００†	不在	不在	直接
ＧＦＡＰ§	不在	不在	間接的
ＭＡＰ１ｂ§	不在	不在	間接的
筋細胞系			
ＧＡＴＡ４§	不在	存在	間接的
Ｎｋｘ２．５‡	不在	存在	間接的
ＭＥＦ２Ｃ‡	不在	存在	間接的
心筋ミオシン†	不在	存在	間接的／ＱＤ
α－筋節アクチン	不在	存在	間接的／ＱＤ
ネスチン	不在	存在	間接的
デスミン	不在	存在	間接的
コネキシン４３	不在	存在	間接的／ＱＤ
Ｎ－カドヘリン	不在	存在	間接的／ＱＤ
血管平滑筋細胞系			
ＧＡＴＡ４§	不在	存在	直接
ＧＡＴＡ６‡	不在	存在	直接
α－平滑筋アクチン†	不在	存在	間接的／ＱＤ
ＴＧＦβ１レセプター	不在	存在	間接的
内皮細胞系			
ＧＡＴＡ４§	不在	存在	直接
Ｅｓｔ１‡	不在	存在	直接
Ｅｒｇ１‡	不在	存在	直接
ビメンチン	不在	存在	間接的
フォン・ヴィレブランド因子†	不在	存在	間接的／ＱＤ
ＶＥ－カドヘリン	不在	存在	間接的
Ｆｌｋ１	不在	存在	間接的

表１．直接標識法は蛍光色素結合一次抗体の使用に相当し、間接的標識法は、非結合一次抗体と蛍光色素結合二次抗体の使用に相当する。蛍光色素結合一次抗体の混合物を使用した：＊カクテル１、§カクテル２、†カクテル３、‡カクテル４。ＱＤは、量子ドット（ＱＤ）による一次抗体の直接標識を示す。間接的／ＱＤは、間接的標識及びＱＤを伴う直接標識の両方を使用したことを示す。

【０２１５】
心転写因子ＧＡＴＡ４および筋細胞転写因子ＭＥＦ２Ｃは上記細胞の一部に存在した。大画分の細胞が、筋細胞、ＳＭＣ、およびＥＣ細胞質タンパク質を発現した。一部の細胞が、神経フィラメント２００に対して陽性を示した（図７０Ｇ～Ｊ）。未分画細胞のＦＡ

ＣＳ分析により、免疫標識によって得られたデータが立証された。細胞化学において、可能な場合には、交差反応および自己蛍光を防ぐため、蛍光色素または量子ドットによって抗体を直接標識した（表１、オンライン）（Ｌｉｎｋｅ，２００５；Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５）。未分画細胞およびｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞のＦＡＣＳに使用した抗体を表２に列挙する（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５）。

【０２１６】

【表２】

表２．ＦＡＣＳ分析用抗体

抗体		会社	標識法
ＣＤ８	（Ｔリンパ球）	ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ	直接（ＦＩＴＣ）
ＣＤ２０	（Ｂリンパ球）	ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ	直接（ＰＥＣｙ５）
ＣＤ３１	（ＰＥＣＡＭ－１）	ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ	直接（ＰＥ）
ＣＤ３４	（シアロムチン）	Ｍｉｌｔｅｎｙｉ	直接（ＦＩＴＣ）
ＣＤ４５	（汎白血球マーカー）	Ｍｉｌｔｅｎｙｉ	直接（ＦＩＴＣ）
ＣＤ４５Ｒ０	（Ｔリンパ球）	Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ	間接的
ＣＤ７１	（トランスフェリンレセプター）	ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ	直接（ＰＥ）
ＣＤ１１７	（ｃ－ｋｉｔ）	Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ	間接的
ＣＤ１１３	（プロミニン様１）	Ｍｉｌｔｅｎｙｉ	直接（ＰＥ）
ＣＤ２４３	（ＭＤＲ）	ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ	直接（ＦＩＴＣ）
グリコホリンＡ	（赤血球）	ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ	直接（ＦＩＴＣ）Ｆｌｋ１
	（ＶＥＧＦ－Ｒ２）	ＡｂＣａｍ	間接的

表２：直接標識法は蛍光色素結合一次抗体の使用に相当し、間接的標識法は、非結合一次抗体と蛍光色素結合二次抗体の使用に相当する（ＰＥ：フィコエリトリン；ＦＩＴＣ：フルオロイソチオシアネート）。ＭＤＲ：多剤耐性；ＰＥＣＡＭ－１：血小板内皮細胞付着分子１；ＶＥＧＦ－Ｒ２：血管内皮増殖因子レセプター２。

【０２１７】

動物における前の結果から（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００１；Ｌｉｎｋｅ，２００５）、細胞を免疫ビーズを用いてＰ０においてｃ－ｋｉｔに対して分類した。ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は、５２±１２％のＬｉｎ$^{-}$細胞および４８±１２％の早期関与細胞を含んだ（図７１Ａ）。ヒト血清の存在下に平板培養したｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は速やかに付着し、Ｐ８まで成長し続け、細胞集団は～２５回倍増した。細胞は安定な表現型を維持し、Ｐ８において成長停止または老齢期に達しなかった。ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞の比率はＰ１からＰ８まで平均７１±８％で不変であった。Ｋｉ６７^{POS}循環細胞（図７１Ｂ）はＰ１からＰ８まで平均４８±１０％で一定を維持した。しかしながら、細胞の６±４％が、細胞老化マーカーであるｐ１６^{INK4a}を発現した（図７１Ｃ）。ＦＡＣＳ分析により、ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は造血細胞系に対して陰性を保ち、大画分がトランスフェリンレセプターＣＤ７１を発現した。これはＫｉ６７と密接に相関する（図７１Ｄ）。未分化状態のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（６３±６％）が心臓細胞の核タンパク質および細胞質タンパク質の不在によって確認された（表１）。幹性を示す中間フィラメントネスチンが６２±１４％のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞において認められた（図７１Ｅ～Ｇ）。

【０２１８】

クローニングアッセイ

ヒトｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞をＰ０で分類し、顕微鏡制御下で、個々のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞をテラサキプレートの各ウェルに０．２５～０．５細胞／ウェルの密度で播種した（

図７１Ｈ）（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｌｉｎｋｅ，２００５）。１つ以上の細胞を含むウェルは除外した。定着すべきｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞の５０±１０％はＬｉｎ$^{－}$であった。ＢｒｄＵ（１０μＭ）を１日３回、５日間にわたり添加した（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｌｉｎｋｅ，２００５）。～３乃至４週間後、６，７００個の単一播種細胞から５３個の小クローンが産生された。即ち、ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}－ｈＣＳＣは０．８％クローニング効率を有した。クローン中の細胞数は２００から１，０００の範囲で変動した（図７１Ｉ）。５３個のクローンのうち１２個は更に成長しなかった。残りの４１個のクローンは増殖し、免疫細胞化学法によって特性分析した。倍増時間は２９±１０時間であり、５日後の細胞の９０±７％がＢｒｄＵ^{ＰＯＳ}であった。デキサメタゾンを使用して分化を誘発し（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｌｉｎｋｅ，２００５）、その結果、筋細胞、ＳＭＣ、およびＥＣを含む心臓細胞系が検出された（図７１Ｊ）。筋細胞が優勢細胞集団であり、ＥＣおよびＳＭＣがそれに続いた（図７５）。

【０２１９】

心筋梗塞

標準免疫抑制法（Ｚｉｍｍｅｒｍａｎｎ，２００２）で処置した雌の免疫不全Ｓｃｉｄマウス（Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５）およびＦｉｓｃｈｅｒ３４４ラット（Ｂｅｌｒａｍｉ，２００３）において麻酔下で心筋梗塞を惹起した。上述のごとく心臓手術をした８人の患者の心筋試料（～３標本／患者）からｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞を単離し、増殖した。かかる試験において、各試料から～２００，０００個のｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞を入手する際に、ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞をＰ０において回収した。このプロトコルには～７週間を要した。冠状動脈閉塞後まもなく、～４０，０００個のヒトｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞を境界域の両側の２箇所に注射した（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｏｒｌｉｃ，２００１；Ｌａｎｚａ，２００４）。動物をＢｒｄＵに暴露し、梗塞および細胞移植の２～３週間後に解剖した（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｏｒｌｉｃ，２００１；Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５；Ｌａｎｚａ，２００４）。心エコー検査を実施し、その２～３日後に、左心室（ＬＶ）圧とｄＰ／ｄｔを測定した（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｏｒｌｉｃ，２００１；Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５；Ｌａｎｚａ，２００４）。心臓を拡張期に停止させ、ホルマリンで潅流して固定した。各心臓で、梗塞サイズ、ヒト筋細胞、細動脈、および毛細血管の形成を判定した（Ａｎｖｅｒｓａ，２００２）。

【０２２０】

２５匹中１７匹の処置マウス（６８％）および１９匹中１４匹の処置ラット（７４％）で修復が見られた。梗塞再構成失敗を適切に説明するため、ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞をローダミン標識小球体と一緒に注射し、注射部位および細胞の適正投与を確認した（Ｌｅｒｉ，２００５；Ｋａｊｔｓｕｒａ，２００５）。処置が失敗した動物は、処理が成功した動物に対して適当な対照と見なされた。完全性を追求し、１２匹の免疫不全梗塞マウスと９匹の免疫抑制梗塞ラットにＰＢＳを注射し、追加対照として使用した。梗塞サイズは、マウスでは平均４８±９％、ラットでは平均５２±１２％で、全群で同様であった。

【０２２１】

梗塞マウスおよびラットの境界域内にヒトｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞が適切に送達された全ケースにおいてヒト心筋が存在した。これらヒト心筋フォーカスは梗塞内に位置し、Ａｌｕプローブを用いたヒトＤＮＡ配列の検出により確認された（Ｊｕｓｔ，２００３）。損失心筋の再構成の程度はマウスにおいては１．３±０．９ｍｍ^{3}、ラットにおいては３．７±２．９ｍｍ^{3}であった（図７２Ａ～Ｃ）。新たに形成された細胞の蓄積は構造体のＢｒｄＵ標識によっても判定した。ＢｒｄＵは、観察期間中ずっと動物に与えた。ヒトｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞は８患者から入手したが、種々のヒト細胞について心修復の程度に明らかな差はなかった。組織再生のばらつきは細胞源とは無関係であり、これは、処置した心臓の回復にその他の要因も影響したことを示唆している。

【０２２２】

ヒト心筋の形成は、梗塞ラットの心壁の梗塞部分におけるヒトＡｌｕＤＮＡ配列の認識によって確認された。更に、ヒトＡｌｕＤＮＡと一緒にヒトＭＬＣ２ｖＤＮＡ配列も同定

された（図７２Ｄ）。同じ動物における残存心筋はヒトＡｌｕＤＮＡ配列もヒトＭＬＣ２ｖＤＮＡ配列も含まなかった。生存心筋はラットＭＬＣ２ｖＤＮＡを示した。

【０２２３】

処置マウスにおいて、ヒト心筋は密集した筋細胞からなり、新組織の８４±６％を占める一方、抵抗細動脈および毛細血管プロファイルは合わせて７±３％を占めた。処置ラットにおいてこれに相当する値は８３±８％および８±４％であった。孤立したヒト血管プロファイルと一緒に分散したヒト筋細胞、ＳＭＣ、およびＥＣが検出され、梗塞全体に散在していた（図７６）。注射が失敗した梗塞マウスおよびラット、またはＰＢＳで処置した動物ではヒト筋細胞、ＳＭＣ、およびＥＣは検出されなかった。

【０２２４】

ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションおよびＰＣＲ

ヒト特異的Ａｌｕ反復配列に対するＦＩＴＣ標識プローブ（Ｂｏｉｇｅｎｅｘ）を用いたｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションによってヒト細胞を検出した（Ｊｕｓｔ，２００３）。更に、ヒトＸ染色体と、マウスおよびラットＸ染色体を同定した（Ｑｕａｉｎｉ，２００２）。ヒト細胞で処置したラットの生存ＬＶおよび梗塞ＬＶの組織片からＤＮＡを抽出した。ヒトＡｌｕ（長さ約３００塩基対であり、霊長類ゲノムに特異的に認められ、ヒトゲノムの１０％以上に存在し、ヒトでは平均距離４ｋｂで位置する）、並びにラットおよびヒトミオシン軽鎖２ｖ配列に対してＰＣＲを実施した（下記表３参照）。

【０２２５】

【表３】

表３．ラット及びヒト細胞の認識：ミオシン軽鎖２ｖ遺伝子及びＡｌｕ配列の検出

ラットミオシン軽鎖２ｖプライマー：

ｒＭｙ１２－Ｓ：ＣＣＴＣＴＡＧＴＧＧＣＴＣＴＡＣＴＧＴＡＧＧＣＴＴＣ（２６ｍｅｒ、融点５５℃）

ｒＭｙ１２－Ａ：ＴＴＣＣＡＣＴＴＡＣＴＴＣＣＡＣＴＣＣＧＡＧＴＣＣ（２５ｍｅｒ、融点５９℃）

ヒトミオシン軽鎖２ｖプライマー：

ｈＭＬＣ２－Ｓ：ＧＡＣＧＴＧＡＣＴＧＧＣＡＡＣＴＴＧＧＡＣＴＡＣ（２４ｍｅｒ、融点５７℃）

ｈＭＬＣ２－Ａ：ＴＧＴＣＧＴＧＡＣＣＡＡＡＴＡＣＡＣＧＡＣＣＴＣ（２４ｍｅｒ、融点５８℃）

Ａｌｕ配列プライマー：

ＡＲＣ－２６ｌｒ：ＧＡＧＡＣＧＧＡＧＴＣＴＣＧＣＴＣＴＧＴＣＧＣ（２３ｍｅｒ、融点６１℃）

表３：各試料を、１５μＬのＰｌａｔｉｎｕｍ　ＰＣＲ　ＢｌｕｅＭｉｘ溶液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び０．２μＭの各プライマーと混合し、ＰＣＴを実施した。ＰＣＲ反応は次のように実施した：９４℃で３０秒間；９４℃で３０秒間、６０℃で３０秒間、及び７２℃で１分間のサイクルを３５回；７２℃で３分間。ＰＣＲ産物は２％アガロースゲル電気泳動で分離した。

【０２２６】

二次抗体による非特異的な標識を避けるため、大半の一次抗体を蛍光色素によって直接標識した（表１）。この予防策にも関わらず、組織片に内在する微量の自己蛍光を排除することは不可能である（Ｌｅｒｉ，２００５；Ｌｉｎｋｅ，２００５；Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５）。この疑似資源を除外するために、可能な場合は、一次抗体を量子ドットに結合した。かかる半導体粒子の励起波長および発光波長は自己蛍光の範囲外とし、変数混同を避ける（Ｌｅｒｉ，２００５）。量子ドット標識は、再生されたヒト心筋バンド内の心筋細胞、ＳＭＣ、およびＥＣの転写因子、細胞質タンパク質、および膜タンパク質の同定

に適用した。

【０２２７】

Ａｌｕプローブによるヒト細胞の認識に続き、転写因子ＧＡＴＡ４およびＭＥＦ２Ｃと一緒に新たな筋細胞中で心筋ミオシン重鎖およびトロポニンＩが検出された。更に、かかる発生筋細胞の表面で結合タンパク質コネキシン４３とＮ－カドヘリンが同定された（図７２Ｅ～Ｊ）。間質においてラミニンも明らかであった。両動物モデルにおいてヒト筋細胞のサイズは１００から２，９００μm^3の範囲で著しく変動した（図７７）。

【０２２８】

雌梗塞マウスおよびラットに雌性ヒト細胞を注射した。従って、マウスおよびラットＸ染色体と共にヒトＸ染色体も同定され、ヒト細胞とマウスまたはラット細胞の融合が検出された。新たに形成された筋細胞、冠状細動脈、毛細血管プロファイルにおいてヒトＸ染色体とマウスまたはラットＸ染色体の共存は認められなかった（図７３Ｈ～Ｍ）。重要なことは、ヒト筋細胞、ＳＭＣ、およびＥＣが最大２つのＸ染色体を持っていたことである。従って、キメラ梗塞心臓におけるヒト心筋の形成において細胞融合は重要な役割を果たしていなかった。

【０２２９】

ヒト心筋の特性分析

ヒトＳＮＣおよびＥＣによってのみ構成される冠状細動脈および毛細血管によってヒトｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞の注入によって媒介される血管形成を明らかにした（図７３Ａ～Ｆ）。マウスまたはラット冠状脈管系においてヒトＳＭＣおよびＥＣの目視可能な統合はなかった。ヒト細胞および非ヒト細胞によって形成された血管が見つかったケースはなかった。ヒト細動脈および毛細血管の数はラットおよびマウスに匹敵し、いずれの場合も、筋細胞８個当たり１つの毛細血管が存在した（図７３Ｇ）。更に、酸素についての拡散距離は平均１８μｍであった。これらの毛細血管パラメーターは胎児期後半およびヒト新生児心臓におけるものと同様である（Ａｎｖｅｒｓａ，２００２）。

【０２３０】

ヒト心筋の機能的コンピテンス

再生されたヒト心筋が機能的にコンピテントであり、梗塞心臓の機能を部分的に回復させるか判定するため、貫壁性梗塞および新規形成ヒト心筋の有無の組織学的資料作成に続き、心エコー図を遡及的に調査した（図７４Ａ～Ｃ；図７８）。心筋再生を、壁の梗塞域における、検出可能な収縮機能に関連付けた。これは、組織再構成がなければ決して起こらなかった。ヒト心筋の形成により、梗塞心室の駆出率が増加した（図７４Ｄ）。更に、心筋再生により、腔拡張が緩和され、ＬＶ質量対腔容積の比が増加し（図７４Ｅ）、梗塞後のＬＶＥＤＰの上昇並びにＬＶＤＰおよび正負ｄＰ／ｄｔの低下を制限することにより心室機能全体を向上させた（図７４Ｆ）。

【０２３１】

関連するところでは、本実施例で提供された結果は平均±ＳＤである。有意性はスチューデントのｔ検定およびボンフェローニ法によって決定した（Ａｎｖｅｒｓａ，２００２）。

【０２３２】

実施例１５：心臓幹細胞による大冠状動脈の形成－生体バイパス

脈管系閉塞に及ぼす、クローン原性ＥＧＦＰＰＯＳ－ｃ－ｋｉｔＰＯＳ－ＣＳＣ（非活性化ＣＳＣ）およびＨＧＦおよびＩＧＦ－１によって活性化されたＥＧＦＰＰＯＳ－ｃ－ｋｉｔＰＯＳ－ＣＳＣ（活性化ＣＳＣ）の注入の効果を比較するため、Ｆｉｓｃｈｅｒ３４４ラットの左冠状動脈を標準方法で閉塞した。非活性化ＣＳＣまたは活性化ＣＳＣ（活性化は移植の２時間前に行なった）を閉塞した左冠状動脈の近辺に移植した。結紮部の解剖学的位置のため、細胞移植部位は、結紮により発生した心室壁の梗塞領域からは離れていた（図８２）。心筋に播種された非活性化ＣＳＣのアポトーシス率は高く、送達の１２および２４時間後から４８時間後まで漸増した（図８３）。細胞死により、１～２週間で移植細胞は完全に消失した。反対に、増殖因子で活性化したＣＳＣの移植では著しい効能が

検出された（図７９ａ）。活性化ＣＳＣは心筋にホーミングし、そこでアポトーシスが急激に細胞複製に勝ったが、のちに細胞分裂が細胞死を上回った（図７９ｂ－ｄ）。

【０２３３】

活性化ＣＳＣおよび非活性化ＣＳＣは梗塞部位における非損傷心筋内に蓄積するが、細胞生着(engraftment)は活性化細胞に限定された。生着には、細胞同士の接触および細胞と細胞外基質の相互作用を確立する表面タンパク質が合成される必要がある（Ｌａｐｉｄｏｔ，２００５）。コネキシン４３、Ｎ－カドヘリンおよびＥ－カドヘリン、Ｌ－セレクチンは、大きな活性化ＣＳＣ画分においてのみ発現した（図７９ｅ）。これらの結合タンパク質および接着タンパク質は、心筋内の非活性化ＣＳＣクラスターにおいては不在であった。

【０２３４】

アポトーシスは生着細胞に影響せず、非生着細胞にのみ関与した（図７９ｆ）。この現象は、プログラムされた細胞死が細胞同士の接触の欠如によって誘発される非生着細胞のアノイキス（ａｎｏｉｋｉｓ）と一致した（Ｆｒｉｓｃｈ，２００１；Ｍｅｌｅｎｄｅｚ，２００４）。

【０２３５】

増殖因子によるＣＳＣの活性化が細胞生着において一役を担うこと、および細胞生着が虚血性損傷とは無関係であることを立証するため、対照である非梗塞マウスの無傷心筋に活性化ＣＳＣを注射した。一ヵ月後、心臓の心外膜域に大量の細胞が存在した（図７９ｇ）。これらの細胞は、コネキシン４３および４５、Ｎ－およびＥ－カドヘリン、Ｌ－セレクチンを発現した。移植細胞は、恐らく組織損傷がないことおよび損失心筋を再生する必要があることから、未分化表現型を維持した（Ｂｅｌｔｒａｍｉ，２００３；Ｏｒｌｉｃ，２００１；Ｍｏｕｑｕｅｔ，２００５）。

【０２３６】

処置の２日後に定量化すると、注入した８０，０００～１００，０００個の非活性化ＣＳＣのうち～５％のみ（４，８００±２，６００）が心筋中に存在した。活性化ＣＳＣの送達後、ＥＧＦＰを発現する大量の細胞が検出された。しかしながら、これらは投与細胞総数４８，０００±１３，０００より明らかに少なかった。これらの細胞は、非生着ＣＳＣおよび生着ＣＳＣのそれぞれ死滅産物および分裂産物であった。

【０２３７】

冠状動脈閉塞によって作り出された心筋環境の変化が活性化ＣＳＣの血管平滑筋（ＳＭＣ）および内皮細胞（ＥＣ）への分化に影響するか判定するため、低酸素症誘導因子－１（ＨＩＦ－１）の発現を判定した。ＨＩＦ－１はＳＤＦ－１ケモカイン１２、およびＳＤＦ－１の転写調節因子であり、これらは虚血に伴いアップレギュレートされ（Ａｂｏｔｔ，２００４；Ｃｅｒａｄｉｎｉ，２００５）、組織内の酸素勾配に関与し得る（Ｂｕｔｌｅｒ，２００５）。この心筋応答は梗塞心筋の縦方向断面で見られ、低酸素状態は梗塞心室の基部から中間部および頂部へ次第に増加した。反対に、ＨＩＦ－１およびＳＤＦ－１は、頂部の死滅心筋内で最も少なく、中間部で幾分か、基部の虚血しているが生存可能な心筋に向かって高度に認められた。ＨＩＦ－１およびＳＤＦ－１は、血管壁の内膜に限定されていた。免疫標識は、ウエスタンブロット法によるＨＩＦ－１およびＳＤＦ－１の局地的発現およびＥＬＩＳＡで測定したＳＤＦ－１レベルと一致した。

【０２３８】

梗塞心臓における伝導性(conductive)冠状動脈およびその分枝の発達に及ぼす活性化ＣＳＣの影響を、冠状動脈結紮および処置の２週間後および１ヵ月後に評価した。有意な規模の血管成長は生後１０～１５日以内に起こるが（Ｏｌｉｖｅｔｔｉ，１９８０；Ｒａｋｕｓａｎ，１９８４）、ラットにおける生後の冠状動脈木構造の成熟には約１ヶ月を要することから（Ａｎｖｅｒｓａ，２００２）、前記の時点を選択した。梗塞および細胞移植の２週間後、新たに形成された大きなＥＧＦＰ陽性冠状動脈が、注射部位の極近傍の心筋外膜に認められた（図８０ａ，ｂ）。生成された血管は残存心筋および、閉塞冠状動脈に近い心臓基部における梗塞の境界を貫通していた。直径≧１５０μｍの伝導性動脈は弾性

内膜を有し、心室の基部および中間部上側の生存心筋に限定された。因みに、左冠状動脈の基点は直径～２７５μｍを有する。再生された血管の隣接域にも遠隔域にも新たに形成されたＥＧＦＰ陽性心筋はなかった。このことは、臓器の局地的な必要性に対するＣＳＣの選択的応答を立証しており、幹細胞成長および分化を調節していると見られる（Ｂａｘｔｅｒ，２０００）。

【０２３９】

直径＜２５μｍの小抵抗細動脈の存在は、瘢痕化梗塞領域に限定された（図８０ｃ）。このサイズの抵抗細動脈は２週間後の残余(spared)心筋内では検出されなかった。同様に、少数の毛細血管が存在したが、梗塞心筋内にのみであった。全ケースで、血管壁はＥＧＦＰ陽性ＳＭＣおよびＥＣのみで構成されていた。再生血管にＥＧＦＰ陰性ＳＭＣまたはＥＣはなかった。これは、血管形成における既存のＳＭＣおよびＥＣと活性化ＣＳＣの細胞系関与の共同的役割の可能性を排除するものである。血管形成は、上記条件下での血管成長機序のみであると見られた。

【０２４０】

梗塞および細胞療法の１ヵ月後、形成された冠状脈管系が、その後に退化する一時的な血管であるか、または時間と共に再に成長する機能的にコンピテントな血管であるか判定するため観察を行った。この期間は、更なる血管成長の検出のためだけでなく、梗塞治癒の特性分析のためでもあった。梗塞治癒はげっ歯類においては～４週間で完了し（Ｆｉｓｈｂｅｉｎ，１９７８）、壊死細胞内にＩＩＩ型およびＩ型コラーゲンの蓄積をもたらす。治癒の早期に存在した血管は次第にアポトーシスによって死滅するので（Ｃｌｅｕｔｊｅｎｓ，１９９９）、瘢痕化した心筋は多くて数個の瘢痕化血管プロファイルを含む。従って、２週間後および１ヶ月後の梗塞心筋および非梗塞心筋において、種々のクラスのＥＧＦＰ陽性冠状血管の分布を測定した。

【０２４１】

１ヶ月後、壁の生存心筋および梗塞領域の両方に、直径が６～２５０μｍの多数のＥＧＦＰ陽性冠状血管が存在し、時間が冠状脈管系の拡充をもたらしたことを示唆した。１ヶ月後、心室壁の残余心筋および梗塞部の両方で、毛細血管プロファイルを伴う大、中、小の冠状動脈および細動脈が検出された。２週間後で述べたように、再生血管はＥＧＦＰ陽性ＳＭＣおよびＥＣのみで構成されていた（図８４）。これらの知見は、１ヶ月後には全クラスの冠状血管が発達したことを示す定量的結果によって支持された（図８０ｄ）。即ち、活性化ＣＳＣはラット冠状血管木構造の種々のセグメントをｄｅ　ｎｏｖｏ生成し得る。

【０２４２】

ＣＳＣの実際の成長可能性を評価するため、冠状動脈クラスおよび毛細血管プロファイルの再構成が常在ＥＣおよびＳＭＣと注入ＣＳＣの間の融合事象を伴うか（Ｗａｇｅｒｓ，２００４）判定した。血管壁内のＥＧＦＰ陽性ＥＣおよびＳＭＣの核内性染色体を測定することにより、ヘテロカリオンの形成を確認した（Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５ａ；Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５ｂ；Ｄａｗｎ，２００５）。雌性クローン原性ＣＳＣを雌性心臓に移植し、新たに形成された血管のＸ染色体の数をＦＩＳＨによって同定した（図８０ｅ）。全ケースで、再生ＥＣおよびＳＭＣにおいては多くて２つのＸ染色体が認められ、細胞融合は、あったとしても、活性化ＣＳＣによる冠状脈管系の回復における役割は小さいことが示唆された。

【０２４３】

新しい心外膜冠状血管が大動脈および既存冠状循環系に機能的に接続しているか判定するため、ｅｘ　ｖｉｖｏ処置を使用した。ローダミン標識デキストラン（ＭＷ７０，０００；赤色蛍光）を含む酸素化タイロード溶液を用い、大動脈を通して逆方向に心臓を連続的に潅流した。この分子は内皮障壁を通過せず、二光子顕微鏡で冠状脈管系全体を可視化できる（Ｕｒｂａｎｅｋ，２００５；Ｄａｗｎ，２００５）。生物学的構造体によるレーザー光の散乱のため（Ｈｅｌｍｃｈｅｎ，２００５）、この分析法は最大～１５０μｍの心筋外膜に限定された。心室壁は厚さ～２．０ｍｍを有する。常在冠状血管および生成さ

れた冠状血管をそれぞれ壁のＥＧＦＰ標識（緑色蛍光）の不在および存在によって区別した。組織コラーゲンは第二高調波発生によって検出された（青色蛍光）。これは、二光子励起とコラーゲンの周期構造の結果である（Ｓｃｈｅｎｋｅ－Ｌａｙｌａｎｄ，２００５）。コラーゲンの離散的局在は、生存心筋に対応するものと推定され、広範なコラーゲンの蓄積は梗塞心筋を表すものと解釈された。

【０２４４】

デキストランによる大動脈からの潅流により、２週間後の処置ラットの非梗塞心筋内で直径約２００μｍの大血管とＥＧＦＰ陽性壁が同定された（図８１ａ）。血管壁近くに最低限のコラーゲンが見られた。２週間後および１ヶ月後の瘢痕化心筋においても同様の血管が認められた（図８１ｂ－ｅ）。時には、新しい冠状血管は梗塞の心外膜領域を横切り（図８１ｅ）、心筋再生の離散的フォーカスに対応するＥＧＦＰ陽性細胞によって部分的に置換されていた（図示なし）。分解能によっては、既存（ＥＧＦＰ陰性壁）冠状血管と生成（ＥＧＦＰ陽性壁）冠状血管の間の直接接続が認められ（図８１ｆ）、これらの一時的に区別される、冠状血管木構造の新旧セグメントの統合を明らかにした。

【０２４５】

細胞処置による冠循環の向上は、心室拡張の緩和、壁厚対腔半径の比および心室質量対腔容積の比の相対的上昇を付随した（図８１ｇ）。これらの解剖学的変数は、心室機能および心筋負荷に著しく影響する（Ｐｆｅｆｆｅｒ，１９９０）。期待されたように、冠循環の再生により梗塞サイズは縮小しなかった（図８１ｇ）。細胞療法は冠状動脈結紮後まもなく実施され、閉塞冠状動脈によって供給されていた心筋細胞は４～６時間で死滅した（Ａｎｖｅｒｓａ，２００２）。しかしながら、左心室拡張終期圧、発生圧力、正負のｄＰ／ｄｔ、および拡張ストレスにおける血行動態変化は全て、細胞療法によって媒介される冠状動脈潅流の改善によって部分的に抑制された（図８１ｈ）。

【０２４６】

実施例１６：大動物モデルにおける心臓幹細胞のカテーテル方式冠状動脈内送達

２つの目的で１５頭のブタを開胸した：１）心房付属組織を切除および採取すること、および２）左前下行遠位冠状動脈を９０分間閉塞して心筋梗塞を誘導し、次いで潅流すること。心房付属物からＣＳＣを採取し、上述のごとくｅｘ　ｖｉｖｏで培養・増殖し、２～３ヵ月（平均８６日）後同じブタに冠状動脈内注射した。７頭のブタが冠状動脈内ＣＳＣ注射を受け、８頭がビヒクル注射を受けた。全てのブタに、一連の心臓マーカー試験、２Ｄ心エコー検査、および（亜群において）侵襲的血行動態モニタリング、内臓の詳細組織病理学検査を実施した。心臓または組織病理学的検査した種々の臓器においてＣＳＣ処置に関連する悪影響の徴候はなく、処置されたブタは、心機能改善の傾向を示した。かかる結果から、この虚血性心筋症大動物モデルにおけるＣＳＣの冠状動脈内送達の安全性および実現可能性が確認された。

【０２４７】

本発明の好ましい実施態様を詳細に記載したが、添付の請求の範囲によって規定される本発明は、本発明の主旨または範囲から逸脱せずとも多くの明らかな変形態様が可能であるから、上記説明で示された特定の詳細に限定されないことが理解される。

【０２４８】

参考文献

1. Abott, J. D. et al. Stromal cell-derived factor-1 alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. Circulation 110, 3300-3305 (2004).
2. Aicher, A. et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. Nat. Med. 9, 1370-1376 (2003).
3. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo J M, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature 2003;425:968-73.

4. Amado L C, Saliaris A P, Schuleri K H, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:11474-9.
5. American Heart Association. 2001 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, Tex.: American Heart Association, 2000.
6. American Heart Association: Heart Disease and Stroke Statistics--2005 Update. URL: www.americanheart.org/downloadable/heart/1105390918119HDSStats2005Update.-pdf
7. Anderson, D. J. "Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual." Neuron (2001) 30, 19-35.
8. Anversa, P. & Olivetti, G. Cellular basis of physiological and pathological myocardial growth. In Handbook of Physiology: The Cardiovascular System: The Heart. (eds. Page, E., Fozzard, H. A. & Solaro, R. J.) 75-144 (Oxford University Press, Oxford, 2002).
9. Anversa, P. and Kajstura, J. "Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart." Circ. Res. (1998) 83, 1-14.
10. Anversa, P. and Nadal-Ginard, B., "Myocyte renewal and ventricular remodelling." Nature. (2002); 415(6868):240-3.
11. Arsenijevic, Y. and Weiss, S., J. Neurosci. "Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor." J Neurosci. (1998) 18(6):2118-28.
12. Arsenijevic, Y. et al., "Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2." J Neurosci. (2001) 21(18):7194-202
13. Asahara, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275, 964-967 (1997).
14. Bache, R. J. Effects of hypertrophy on the coronary circulation. Prog. Cardiovasc. Dis. 30, 403-440 (1988).
15. Balsam L B, Wagers A J, Christensen J L, Kofidis T, Weissman I L, Robbins R C. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischemic myocardium. Nature 2004;428:668-73.
16. Bautz, F. et al., "Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine stimulated hematopoietic progenitor cells. Possible role in the hematopoietic microenvironment." Exp Hematol 2000 June; 28(6):700-6.
17. Baxter, A. G. The cells that knew too much. J. Clin. Invest. 105, 1675 (2000).
18. Beardsle, M. A. et al., "Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart." Circ. Res. (1998) 83, 629-635.
19. Beltrami A P, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003;114:763-76.
20. Beltrami, A. P. et al. "Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction." N Engl J Med. (2001) 344(23):1750-7.
21. Beltrami, A. P. et al., "Chimerism of the transplanted heart." N Engl J Med. (2002) 346(1):5-15.
22. Beltrami, A. P. et al., Submitted (2002).
23. Beltrami, C. A. et al., "Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans." Circulation (1994) 89, 151-163.
24. Bianco, P. et al. "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." Stem Cells (2001) 19:180-192.

25. Birchmeier, C. and Brohmann, H., Curr. Opin. Cell Biol. 12, 725 (2001).
26. Blackstone, E. H. & Lytle, B. W. Competing risks after coronary bypass surgery: the influence of death on reintervention. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 119, 1221-1230 (2000).
27. Blanpain C, Lowry W E, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. Cell 2004;118:63 5-48.
28. Blau, H. M. et al., "The evolving concept of a stem cell: entity or function?" Cell. (2001);105(7):829-4 1.
29. Block, G. D. et al., J. Cell Biol. 132, 1133 (1996).
30. Blume et al., "A review of autologous hematopoetic cell transplantation." Biology of Blood & Marrow Transplantation, (2000) 6: 1-12.
31. Bodine, D. M. et al., "Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells mobilized into the peripheral blood by treatment with granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor." Blood (1994) 84, 1482-1491.
32. Breier, G. et al., "Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system." Blood (1996) 87, 630-641.
33. Britten, M. B. et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. Circulation 108, 2212-2218 (2003).
34. Brooker, G. J. et al., "Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells." J Neurosci Res. (2000) 59(3):332-41.
35. Broudy, V. C. "Stem cell factor and hematopoiesis." Blood (1997) 90, 1345-1364.
36. Brugger et al., "Ex vivo manipulation of hematopoetic stem and progenitor cells. Seminars in Hematology." (2000), 37 (1): 42-49.
37. Bunting, K. D. et al., Blood 96, 902 (2000).
38. Butler, J. M. et al. SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. J. Clin. Invest. 115, 86-93 (2005).
39. Caceres-Cortes, J. R. et al., "Steel factor sustains SCL expressionand the survival of purified CD34+ bone marrow cells in the absence of detectable cell differentiation." Stem Cells (2001) January;19(1):59-70.
40. Capasso, J. M. and Anversa, P., Am. J. Physiol. 263, H841 (1992).
41. Caplan A. I. and Haynesworth S. E., "Method for enhancing the implantation and differentiation of marrow-derived mesenchymal cells." Filed Nov. 16, 1990. U.S. Pat. No. 5,197,985
42. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature 438, 932-936 (2005).
43. Ceradini, D. J. & Gurtner G. C. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. Trends Cardiovasc. Med. 15, 57-63 (2005).
44. Ceradini, D. J. et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. Nat. Med. 10, 858-864 (2004).
45. Cheng, W. et al. "Aging does not affect the activation of the myocyte IGF-1 autocrine system after infarction and ventricular failure in Fischer 344 rats." Circ. Res. (1996) 78, 536-546.
46. Chien K R. Stem cells: lost in translation. Nature 2004;428:607-8.

47. Chimenti C, Kajstura J, Torella D, et al. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. Circ Res 2003;93:604-13.
48. Chiu et al., "Cellular Cardiomyoplasty: Mycardial Regeneration With Satellite Cell Implantation." Ann. Thorac. Surg.(1995) 60: 12-18.
49. Cleutjens, J. P. M., Blankesteijn, W. M., Daemen, M. J. A. P. & Smits, J. F. M. The infarcted myocardium: Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. Cardiovasc. Res. 44, 232-241 (1999).
50. Clutterbuck, R. D. et al., "G-CSF mobilization of haemopoietic cell populations in SCID mice engrafted with human leukaemia." Bone Marrow Transplant (1997) August; 20(4):325-32.
51. Coles, J. G. et al., "Inhibition of Human Xenogenic or Allogenic Antibodies to Reduce Xenograft or Allograft Rejection in Human Recipients". Patent No. WO 95/34581A1, published Dec. 21, 1995.
52. Condorelli, G. et al.,"Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A. (2001) 98(19):10733-8.
53. Coultas, L., Chawengsaksophak, K. & Rossant, J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. Nature 438, 937-945 (2005).
54. Couper, L. L. et al., "Vascular endothelial growth factor increases the mitogenic response to fibroblast growth factor-2 in vascular smooth muscle cells in vivo via expression of fms-like tyrosine kinase-1." (1997) Circ. Res. 81, 932-939.
55. Dang N C, Johnson C, Eslami-Farsani M, Haywood L J. Bone marrow embolism in sickle cell disease: a review. Am J Hematol 2005;79:61-7.
56. Dawn, B. et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 3766-3771 (2005).
57. Development." (1993) Development 118(2), 489-498.
58. Dinsmore, J. "Procine Cardiomyocytes and Their Use in Treatment of Insufficient Cardiac Function". Patent No. WO 96/38544, published Dec. 5, 1996.
59. Durocher, D. et al., "The cardiac transciption factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors." EMBO J. 16, 5687-5696 (1997).
60. Eisenberg, C. A & Bader, D. "QCE-6: a clonal cell line with cardiac myogenic and endothelial cell potentials." Dev. Biol. (1995) 167, 469-481.
61. Field L. J. "Myocardial grafts and cellular compositions." Filed Jun. 7, 1995. U.S. Pat. No. 5,733,727.
62. Field L. J. "Non-human mammal having a graft and methods of delivering protein to myocardial tissue." Filed Nov. 16, 1992. U.S. Pat. No. 5,602,301.
63. Field, L. J. "Myocardial Grafts and Cellular Compositions Useful for Same." Patent No. WO 95/14079A1, published May 26, 1995.
64. Fielding et al., "Autologous bone marrow transplantation." Curr. Opin. Hematology, 1994, 1: 412-417.
65. Fishbein, M. C., Maclean, D. & Maroko, P. R., Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. Am. J. Pathol. 90, 57-70 (1978).
66. Frisch, S. M. & Screaton, R. A. Anoikis mechanisms. Curr. Opin. Cell Biol. 5, 555-562 (2001).
67. Gillis S. "Method for improving autologous transplantation." Filed Sep. 26, 1991. U.S. Pat. No. 5,199,942

68. Gritti, A. et al. "Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain." J. Neurosci. (1999) 19, 3287-3297.
69. Gussoni et al., "Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation." Nature 356:435-438 (1992).
70. Hamasuna, R. et al. "Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in human glioma cells: HGF/SF enhances MMP-2 expression and activation accompanying up-regulation of membrane type-1 MMP." Int J Cancer. (1999) 82(2):274-81.
71. Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. Nat. Methods 2, 932-940 (2005).
72. Hermann, H. and Aebi, U. "In Subcellular Biochemistry: Intermediate Filaments." Vol. 31 (ed. Herrmann, H. & Harris, E.) 319-362 (Plenum Press, New York, 1998).
73. Hidemasa, O. et al. "Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10308-10313 (2001).
74. Hillebrands, J-L. et al. "Origin of neointimal endothelium and .alpha.-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis." J. Clin. Invest. (2001) 107, 1411-1422.
75. Huang H. M. et al., "Optimal proliferation of a hematopoietic progenitor cell line requires either costimulation with stem cell factor or increase of receptor expression that can be replaced by overexpression of Bcl-2. Blood." 1999 Apr. 15;93(8):2569-77.
76. Ikuta, K. et al., "Mouse hematopoietic stem cells and the interaction of c-kit receptor and steel factor." International Journal of Cell Cloning 1991; 9:451-460.
77. Jackson, K. A. et al., "Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A. (1999) 96(25):14482-6.
78. Jackson, K. A. et al., J. Clin. Invest. (2001) 107, 1395.
79. Janowska-Wieczorek, A. et al., "Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis." Stem Cells 2001; 19:99-107.
80. Jessup, M. & Brozena, S. Heart failure. N. Engl. J. Med. 348, 2007-2018 (2003).
81. Jo, D. Y. et al., "Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1." The Journal of Clinical Investigation 2000 January; 105(1):101-111.
82. Just L, Timmer M, Tinius J, et al. Identification of human cells in brain xenografts and in neural co-cultures of rat by in situ hybridisation with Alu probe. J Neurosci Methods 2003;126:69-77.
83. Kachinsky, A. M. et al., "Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart." (1995) J. Histochem. Cytochem. 43, 843-847.
84. Kajstura J, Rota M, Whang B, et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. Circ Res 2005;96:127-37.
85. Kajstura, J. et al. "Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats." Lab. Invest. (1996) 74, 86-107.
86. Kajstura, J. et al., "The cellular basis of pacing-induced dilated cardiomyo

pathy. Myocyte cell loss and myocyte cellular reactive hypertrophy." (1995) Circulation 92, 2306-2317.
87. Kanj et al., "Myocardial ischemia associated with high-dose carmustine infusion." Cancer, 1991, 68 (9): 1910-1912.
88. Kasahara, H. et al., "Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein." (1998) Circ. Res. 82, 936-946.
89. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. Blood 2004;104:3581-87.
90. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. Circulation 2003;107:461-8.
91. Kedes, L. H. et al., "Compositions and Methods for Transduction of Cells." Patent No. WO 95/12979A1, published May 18, 1995.
92. Kehat, I. et al. "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of myocytes." J. Clin. Invest. (2001) 108, 407-414.
93. Keil F. et al., "Effect of interleukin-3, stem cell factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on committed stem cells, long-term culture initiating cells and bone marrow stroma in a one-step long-term bone marrow culture." Ann Hematol. 2000 May;79(5):243-8.
94. Kempermann, G. et al., "Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair." Prog Brain Res 2000; 127:35-48.
95. Kim, C. H. and Broxmeyer H. E., "In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment." Blood 1998 Jan. 1; 91(1):100-10.
96. Kocher, A. A. et al., "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis reduces remodeling and improves cardiac function." Nature Medicine 2001 April; 7(4):430-436.
97. Koh et al., "Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart." Journal of Clinical Investigation 92:1548-1554 (1993).
98. Krause, D. S. et al., "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." Cell (2001) May;105(3)369-370.
99. Kronenwett, R. et al., "The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells." Stem Cells 2000; 18:320-330.
100. LaIuppa, J. A. et al., "Evaluation of cytokines for expansion of the megakaryocyte and ranulocyte lineages." Stem Cells (1997) May:15(3):198-206.
101. Lanza R, Moore M A, Wakayama T, et al. Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation. Circ Res 2004;94:820-7.
102. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? Blood 106, 1901-1910 (2005).
103. Lee, J. Y. et al. "Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing." J. Cell Biol. (2000) 150, 1085-1099.
104. Leong F T, Freeman L J. Acute renal infarction. JR Soc Med 2005;98:121-2.
105. Leor et al., "Transplantation of Fetal Myocardial Tissue Into the Infarcted Myocardium of Rat, A Potential Method for Repair of Infarcted Myocardium?" Circulation 94:(Supplement II) II-332-II-336 (1996).
106. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocard

ial regeneration. Physiol Rev 2005;85:1373-416.
107. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Identity deception: not a crime for a stem cell. Physiology (Bethesda) 2005;20:162-8.
108. Leri, A. et al., Circ. Res. 84, 752 (1999).
109. Li et al., "Method of Culturing Cardiomyocytes from Human Pediatric Ventricular Myocardium." (1992) J. Tiss. Cult. Meth.; 93-100.
110. Li et al., "In Vivo Survival and Function of Transplanted Rat Cardiomyocytes" Circulation Research 78:283-288 (1996).
111. Li et al., "Cardiomyocyte Transplantation Improves Heart Function" (1996) The Society of Thoracic Surgeons; 62: 654-661.
112. Li et al., "Human Pediatric and Adult Ventricular Cardiomyocytes in Culture: Assessment of Phenotypic Changes with Passaging" Feb. 20, 1996 Cardiovascular Research; 1-12.
113. Li et al., Cardiovascular Res. 32:362-373 (1996).
114. Li et al., J. Mol. Cell. Cardiol., 26:A162 (1994).
115. Li, B et al., "Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart." (1999) Circ. Res. 84, 1007-1019.
116. Li, P. et. al. "Myocyte performance during evolution of myocardial infarction in rats: effects of propionyl-L-carnitine." Am. J. Physiol. (1995) 208, H1702-H1713.
117. Li, Q. et al. "Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy." J Clin Invest. 100, 1991-1999 (1997).
118. Lin, Q. et al., "Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C." (1997) Science 276, 1404-1407.
119. Linke A, Muller P, Nurzynska D, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:8966-71.
120. Lopez L R, Schocket A L, Stanford R E, Claman H N, Kohler P F. Gastrointestinal involvement in leukocytoclastic vasculitis and polyarteritis nodosa. J Rheumatol 1980;7:677-84.
121. MacLellan, W. R. and Schneider, M. D. "Genetic dissection of cardiac growth control pathways." Annu. Rev. Physiol. (2000) 62, 289-319.
122. Malouf, N. N. et al., "Adult derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo." Am J Pathology 2001 June; 158(6)1929-35.
123. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. J Biol Chem 2004;279:11384-91.
124. Maude G H. Bone marrow infarction in sickle cell anemia. Blood 1984;63:243.
125. Melendez, J. et al. Cardiomyocyte apoptosis triggered by RAFTK/pyk2 via src kinase is antagonized by Paxillin. J. Biol. Chem. 279, 53516-53523 (2004).
126. Menasche, P. et al., (2000) Lancet 357, 279-280.
127. Messina E, De Angelis L, Frati G. et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. Circ Res 2004;95:911-21.
128. Mikawa, T. & Fishman, D. A. "The polyclonal origin of myocyte lineages." Annu. Rev. Physiol. (1996) 58, 509-521 .
129. Mohr A, Zwacka R M, Jarmy G, et al. Caspase-8L expression protects CD34+ hematopoietic progenitor cells and leukemic cells from CD95-mediated apoptosis. Oncogene 2005;24:2421-9.
130. Monga, S. P. et al."Expansion of hepatic and hematopoietic stem cells utili

zing mouse embryonic liver explants." (2001) Cell Transplant. January-February; 10(1), 81-89.
131. Morin, S. et al., "GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters." (2000) EMBO J. 19, 2046-2055.
132. Mouquet, F. et al. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. Circ. Res. 97, 1090-1092 (2005).
133. Murray et al., "Skeletal Myobalst Transplantation for Repair of Myocardial Necrosis" J. Clin. Invest. 98:2512-2523 (1996).
134. Murry C E, Soonpaa M H, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. Nature 2004;428:664-8.
135. Musil, L. S. et al., "Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function." (2000) J. Biol. Chem. 275, 25207-25215.
136. Nakamura T, Schneider M D. The way to a human's heart is through the stomach: visceral endoderm-like cells drive human embryonic stem cells to a cardiac fate. Circulation 2003;107:2638-9.
137. National Institutes of Health. "Stem Cells : A Primer." National Institutes of Health: May 2000.
138. Noishiki et al., "Angiogenic growth factor release system for in vivo tissue engineering: a trial of bone marrow transplantation into ischemic myocardium." (1999) J. Artif. Organs, 2: 85-91.
139. Nygren J M, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. Nat Med 2004;10:494-501.
140. Oh H, Bradfute S B, Gallardo T D, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:123 13-8.
141. Olivetti, G. et al., "Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats." (1991) Circ. Res. 68(3), 856-869.
142. Olivetti, G., Anversa, P. & Loud, A. V. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. Circ. Res. 46, 503-512 (1980).
143. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001;410:701-5.
144. Orlic, D. et al., (1993) Blood 91, 3247-3254.
145. Orlic, D. et al., "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." Proc Natl Acad Sci U S A. (2001) 98(18):10344-9.
146. Page, D. L. et al., "Myocardial changes associated with cardiogenic shock." N Engl J Med. (1971) 285(3):133-7.
147. Pasumarthi, K. B. S. et al., "Coexpression of mutant p53 and p193 renders embryonic stem cell-derived cardiomyocytes responsive to the growth-promoting activities of adenoviral EIA." Circ Res. (2001) 88(10):1004-11.
148. Patchen, M L et al. "Mobilization of peripheral blood progenitor cells by Betafectin.RTM. PGG-glucan alone and in combination with granulocyte colony-stimulating factor." Stem Cells (1998) May; 16(3):208-217.
149. Patel, A. N., et al., "Surgical treatment for congestive heart failure with

autologous adult stem cell transplantation: A prospective randomized study." The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery (2005) December; 130(6):1631-38.
150. Perrin, E. C., et al., "Transendocardial autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure." Circulation (2003); 107:2294-2302.
151. Pfeffer, M. A. and Braunwald, E. "Ventricular remodeling after myocardial infarction." Circulation 81, 1161-1172 (1990).
152. Pfister O, Mouquet F, Jain M, et al. CD31- but not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. Circ Res 2005;97:52-61.
153. Pollick, C. et al., "Echocardiographic and cardiac Doppler assessment of mice." (1995) J. Am. Soc. Echocardiogr. 8, 602-610 (1995).
154. Powell, E. M. et al., Neuron. 30, 79 (2001).
155. Quaini, F. et al. "Chimerism of the transplanted heart." (2002) N Engl J Med.346(1):5-15 N.
156. Rakusan K, Flanagan M F, Geva T, Southern J, Van Praagh R. Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy. Circulation 1992;86:38-46.
157. Rakusan, K. Cardiac growth, maturation, and aging. In Growth of the Heart in Health and Disease (ed Zak, R.) 131-164 (Raven Press, New York,1984).
158. Rao, M. S. and Mattson, M. P. "Stem cells and aging: expanding the possibilities. Mech. Ageing Dev. (1998) 122, 713-734.
159. Rappolee, D. A. et al., Circ. Res. 78, 1028 (1996).
160. Reiss, K. et al., "Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice." (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(16), 8630-8635.
161. Reya, T. et al., "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." (2001) Nature 414(6859):105-11.
162. Roberts M. M., et al., "Prolonged release and c-kit expression of haemopoietic precursor cells mobilized by stem cell factor and granulocyte colony stimulating factor." Br J Haematol. 1999 March;104(4):778-84.
163. Rosenthal, N. and Tsao, L. "Helping the heart to heal with stem cells." Nature Medicine 2001 April; 7(4):412-413.
164. Rossi D J, Bryder D, Zahn J M, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:9194-9.
165. Saegusa M, Takano Y, Okudaira M. Human hepatic infarction: histopathological and postmortem angiological studies. Liver 1993;13:239-45.
166. Sanderson, W. C. & Scherbov, S. Average remaining lifetimes can increase as human populations age. Nature 435, 811-813 (2005).
167. Schenke-Layland, K., Riemann, I., Stock, U. A. & Konig, K. Imaging of cardiovascular structures using near-infrared femtosecond multiphoton laser scanning microscopy. J. Biomed. Opt. 10, 024017 (2005).
168. Scholzen, T., and Gerdes, J. "The ki-67 protein: from the known and the unknown." J. Cell. Physiol. 182, 311-322 (2000).
169. Seale, P. et al. "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." Cell (2000) 102, 777-786.
170. Sherman, W. "Cellular therapy for chronic myocardial disease: nonsurgical approaches." Basic Appl. Myol. (2003); 13(1): 11-14.
171. Shihabuddin, L. S. et al., "Adult spinal cord stem cells generate neurons a

fter transplantation in the adult dentate gyrus." J. Neurosci. (2000) 20, 8727-8735.
172. Shimomura T., et al., "Thrombopoietin stimulates murine lineage negative, Sca-1+, C-Kit+, CD34-cells: comparative study with stem cell factor or interleukin-3." Int J Hematol. (2000) January;71(1):33-9.
173. Silver J. et al., "Methods of reducing glial scar formation and promoting axon and blood vessel growth and/or regeneration through the use of activated immature astrocytes." Filed Oct. 27, 1989. U.S. Pat. No. 5,202,120.
174. Simnett et al. "Autologous stem cell translantation for malignancy: a systemic review of the literature." Clin. Lab Haem. 2000, 22:61-72.
175. Smith D. A. and Townsend L E. "Method of isolation, culture and proliferation of human atrial myocytes." Filed Sep. 21, 1995. U.S. Pat. No. 5,543,318
176. Smith D. A. et al., "Method for inducing human myocardial cell proliferation." Filed Apr. 4, 1995. U.S. Pat. No.5,580,779
177. Soonpaa et al. "Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium." (1994) Science 264(5155):98-101.
178. Stainer, D. Y. R. et al., "Cardiovascular development in zebrafish. I. Myocardial fate and heart tube formation." Development (1993) 119, 31-40.
179. Strobel, E S et al. "Adhesion and migration are differentially regulated in hematopoietic progenitor cells by cytokines and extracellular matrix." Blood (1997) November 1; 90(9):3524-3532.
180. Taylor, D. A. et al. (1998) Nature Med. 4, 929-933.
181. Temple, S. "Opinion: Stem cell plasticity--building the brain of our dreams." Nat Rev Neurosci 2001 July;2(7):513-520.
182. Terada, N. et al. Nature, Advanced online publication DOI: nature730, (2002).
183. Thompson et al. Science 257:868-870 (1992).
184. Tomita, S et al. (1999) Circulation 100(suppl II), II-247-II-256.
185. Tropepe, V. et al. "Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF developing mouse telencephalon." Dev. Biol. (1999) 208, 166-188.
186. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. Circ Res 2005;97:663-73.
187. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:10440-5.
188. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:86927.
189. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. Circ Res 2004;95:343-53.
190. Vassilopoulos G, Wang P R, Russell D W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature 2003;422:901-4.
191. Vaughn et al. "Incorporating bone marrow transplantation into NCCN guidelines." (1998) Oncology, 12 (11A): 390-392.
192. Wagers, A. J. & Weissman, I. L. Plasticity of adult stem cells. Cell 116, 639-648 (2004).
193. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature 2003;422:897-901.
194. Wang, H. and Keiser, J. A., "Hepatocyte growth factor enhances MMP activity

in human endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun. 2000 ;272(3):900-5.
195. Watanabe K, Abe H, Mishima T, Ogura G, Suzuki T. Polyangitis overlap syndrome: a fatal case combined with adult Henoch-Schonlein purpura and polyarteritis nodosa. Pathol Int 2003;53:569-73.
196. Weimann J M, Johansson C B, Trejo A, Blau H M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. Nat Cell Biol 2003;5:959-66.
197. Weimar, I. S. et al., "Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+)." Exp Hematol. (1998) 26(9):885-94.
198. Xing, X. et al., Am. J. Pathol. 158, 1111 (2001).
199. Yamaguchi, T. P. et al., "Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors.
200. Ying, Q-L. et al., Nature, Advanced online publication DOI: nature729, (2002).
201. Yoon Y S, Wecker A, Heyd L, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. J Clin Invest 2005;1 5:326-38.
202. Yu, C. Z. et al., Stem Cells 16, 66 (1998).
203. Zaucha, J. M. et al. "Hematopoietic responses to stress conditions in young dogs compared with elderly dogs." Blood (2001) 98, 322-327.
204. Zimmermann W H, Didie M, Wasmeier G H, et al. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngeneic rats. Circulation 2002;106:I151-7.
205. Ko, S H et al., J Biol chem. 2006 (epub ahead of print)
206. Kanemura Y et al, Cell Transplant. 14:673-682, 2005
207. Kaplan R N et al, Nature 438:750-751, 2005
208. Xu R H, Methods Mol Med. 121:189-202, 2005
209. Quinn J et al, Methods Mol Med. 121:125-148, 2005
210. Almeida M et al, J Biol Chem. 280:41342-41351, 2005
211. Barnabe-Heider F et al, Neuron 48:253-265, 2005
212. Madlambayan G J et al, Exp Hematol 33:1229-1239, 2005
213. Kamanga-Sollo E et al, Exp Cell Res 311:167-176, 2005
214. Heese O et al, Neuro-oncol. 7:476-484, 2005
215. He T et al, Am J Physiol. 289:H968-H972, 2005
216. Beattie G M et al, Stem Cells 23:489-495, 2005
217. Sekiya I et al, Cell Tissue Res 320:269-276, 2005
218. Weidt C et al, Stem Cells 22:890-896, 2004
219. Encabo A et al, Stem Cells 22:725-740, 2004
220. Buytaeri-Hoefen K A et al, Stem Cells 22:669-674, 2004

【図面の簡単な説明】

【０２４９】

【図１】図１は、ｃ－ｋｉｔ発現に基づきＦＡＣＳによって分類されたＥＧＦＰトランスジェニックマウス由来のＬｉｎ⁻骨髄細胞を示す対数グラフである（ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞画分（上方ゲート）は６．４％であった。ｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞は下方ゲートに示す。ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞はｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞より対数で１～２明るかった）。

【図２】図２Ａは、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（写真は、骨髄由来のＬｉｎ⁻ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入した心筋梗塞（ＭＩ）領域（矢印）、残留生存心筋（ＶＭ）および再生心筋（矢頭）を示す。倍率は１２倍である）。図２Ｂは、図２Ａと同じ組織片を、ＭＩ領域を中心に高倍率（５０倍）で示す写真である。図２ＣおよびＤは、Ｌｉ

ｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入したＭＩ領域の組織片を低倍率および高倍率で示す写真である。図２Ｃの倍率は２５倍であり、図２Ｄの倍率は５０倍である。図２Ｅは、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}細胞を注入したＭＩ領域の組織片の写真である。治癒のみが明らか。倍率は５０倍である（＊壊死筋細胞。赤色＝心筋ミオシン；緑色＝核のＰＩ標識化）

【図３】図３Ａ～Ｃは、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真であり、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入したＭＩ領域を示す（心内膜（ＥＮ）から心外膜（ＥＰ）に致る再生心筋域が明らか。全ての写真が、心内膜下の梗塞組織（ＩＴ）と心内膜下の残余筋細胞（ＳＭ）の存在を示すよう標識してある。図３Ａは、ＥＧＦＰの存在を示すよう染色されており（緑色）、倍率は２５０倍である。図３Ｂは、ミオシンの存在を示すよう染色されており（赤色）、倍率は２５０倍である。図３Ｃは、ＥＧＦＰと心筋ミオシン（赤色－緑色）およびＰ１染色核（青色）の存在を示すよう染色されており、倍率は２５０倍である）。

【図４】図４Ａは、左心室拡張終期圧（ＬＶＥＤＰ）、発生圧力（ＬＶＤＰ）、ＬＶ＋圧力上昇率（ｄＰ／ｄｔ）、およびＬＶ－圧力低下率（ｄＰ／ｄｔ）に及ぼす心筋梗塞の影響を示すグラフトである（左から右に、各棒は、疑似手術マウス（ＳＯ，ｎ＝１１）、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞非注入マウス（ＭＩ，Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{NEG}注入：ｎ＝５；非注入：ｎ＝６）、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞注入マウス（ＭＩ＋ＢＭ，ｎ＝９）を示す。誤差棒は標準偏差である。＊†ｐ＜０．０５でＳＯおよびＭＩに対して）。図４Ｂは、心筋におけるＬｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞分化および機能的意味のスキーム案の図である。

【図５】図５Ａ～Ｉは、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入したＭＩ領域における再生心筋を示すＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図５ＡはＥＧＦＰの存在を示すよう染色されている（緑色）。倍率は３００倍である。図５Ｂは、細動脈におけるα－平滑筋アクチンの存在を示すよう染色されている（赤色）。倍率は３００倍である。図５Ｃは、ＥＧＦＰとα－平滑筋アクチン（黄色－赤色）およびＰＩ染色核（青色）の存在を示すよう染色されている。倍率は３００倍である。図５Ｄ～ＦおよびＧ～Ｉは、心筋ミオシン陽性細胞におけるＭＥＦ２およびＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５の存在を示す。図５ＤはＰＩ染色核を示す（青色）。倍率は３００倍である。図５ＥはＭＥＦ２およびＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５標識を示すよう染色されている（緑色）。倍率は３００倍である。図５Ｆは心筋ミオシン（赤色）と、ＰＩを伴うＭＥＦ２またはＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５（核内の明色蛍光）を示すよう染色されている。倍率は３００倍である。図５ＧはＰＩ染色核を示す（青色）。倍率は３００倍である。図５Ｈは、はＭＥＦ２およびＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５標識を示すよう染色されている（緑色）。倍率は３００倍である。図５Ｉは心筋ミオシン（赤色）と、ＰＩを伴うＭＥＦ２またはＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５（核内の明色蛍光）を示すよう染色されている。倍率は３００倍である。

【図６】図６（図６Ａ～Ｆ）は、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入されたＭＩ領域における再生心筋を示す、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図６Ａ～Ｃは、ＢｒｄＵに対する抗体の存在下にインキュベートした組織を示す。図６ＡはＰＩ標識核を示すよう染色されている（青色）。倍率は９００倍である。図６ＢはＢｒｄＵ標識核およびＫｉ６７標識核を示すよう染色されている（緑色）。倍率は９００倍である。図６Ｃはα－筋節アクチンの存在を示すよう染色されている（赤色）。倍率は９００倍である。図６Ｄ～Ｆは、Ｋｉ６７に対する抗体の存在下にインキュベートした組織を示す。図６ＤはＰＩ標識核を示すよう染色されている（青色）。倍率は５００倍である。図６ＥはＢｒｄＵ標識核およびＫｉ６７標識核を示すよう染色されている（緑色）。倍率は５００倍である。図６Ｆはα－平滑筋アクチンの存在を示すよう染色されている（赤色）。倍率は５００倍である。明色蛍光：ＰＩとＢｒｄＵ（Ｃ）またはＫｉ６７（Ｆ）の組合せ）。

【図７】図７（図７Ａ～Ｃ）は、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入されたＭＩ領域を示す、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（境界域、生存心筋（ＶＭ）および梗塞非修復組織域（矢印）によって分離された新たな心筋バンド（ＮＢ）を示す。図７ＡはＥＧＦＰの存在を示すよう染色されている（緑色）。倍率は２８０倍である。図７Ｂは心筋ミオシンの存在を示すよう染色されている（赤色）。倍率は２８０倍である。図７Ｃは、

ＥＧＦＰとミオシン（赤色－緑色）およびＰＩ染色核（青色）の存在を示すよう染色されている。倍率は２８０倍である）。

【図８】図８（図８Ａ～Ｆ）は、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入されたＭＩ領域における再生心筋を示す、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図８ＡはＥＧＦＰの存在を示すよう染色されている（緑色）。倍率は６５０倍である。図８Ｂは心筋ミオシンの存在を示すよう染色されている（赤色）。倍率は６５０倍である。図８Ｃは、ＥＧＦＰとミオシン（黄色）およびＰＩ染色核（青色）の存在を示すよう染色されている。倍率は６５０倍である。図８ＤはＥＧＦＰの存在を示すよう染色されている（緑色）。倍率は６５０倍である。図８Ｅは細動脈内のα－平滑筋の存在を示すよう染色されている（赤色）。倍率は６５０倍である。図８Ｆは、ＥＧＦＰとα－平滑筋アクチン（黄色－赤色）およびＰＩ染色核（青色）の存在を示すよう染色されている。倍率は６５０倍である）。

【図９】図９（図９Ａ～Ｃ）は、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入されたＭＩ領域および再生心筋（矢頭）を示す、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図９Ａは心筋ミオシンの存在を示すよう染色されている（赤色）。倍率は４００倍である。図９ＢはＹ染色体の存在を示すよう染色されている（緑色）。倍率は４００倍である。図９Ｃは、Ｙ染色体（淡青色）およびＰＩ染色核（濃青色）の存在を示すよう染色されている。心内膜下における梗塞組織（ＩＴ）中および心外膜下における残余の心臓細胞（ＳＭ）中のＹ染色体の欠如に留意されたい。倍率は４００倍である）。

【図１０】図１０（図１０Ａ～Ｃ）は、心筋ミオシン陽性細胞におけるＧＡＴＡ－４を示す、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図１０ＡはＰＩ染色核を示す（青色）。倍率は６５０倍である。図１０ＢはＧＡＴＡ－４標識の存在を示す（緑色）。倍率は６５０倍である。図１０Ｃは、ＧＡＴＡ－４およびＰＩ（核中の明色蛍光）と合せて心筋ミオシン（赤色）を示すよう染色されている。倍率は６５０倍である）。

【図１１】図１１（図１１Ａ～Ｄ）はＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図１１Ａは梗塞組織と残存組織の境界域を示す。倍率は５００倍である。図１１Ｂは再生心筋を示す。倍率は８００倍である。図１１Ｃはコネキシン４３（黄色－緑色）の存在を示すよう染色されており、筋細胞間接触を矢印で示す。倍率は８００倍である。図１１Ｄは、α－筋節アクチン（赤色）とＰＩ染色核（青色）を示すよう染色されている。倍率は８００倍である。）。

【図１２】図１２（図１２Ａ～Ｂ）は、Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注入されたＭＩ領域示す、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真であり、再生筋細胞を示す（図１２Ａは心筋ミオシン（赤色）およびＰＩ染色核（黄色－緑色）の存在を示すよう染色されている。倍率は１，０００倍である。図１２Ｂは図１２Ａと同様であるが、倍率が７００倍である）。

【図１３】図１３Ａ～ＢはＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図１３Ａは、形成心筋を伴う（矢頭）サイトカイン処置マウスにおける大規模梗塞（ＭＩ）を高倍率（５０倍）で示す（８０倍－隣のパネル）。図１３Ｂは、非処置マウスにおけるＭＩを示す。治癒は梗塞全体に及ぶ（矢頭）（倍率は５０倍）。瘢痕を高倍率で示す（８０倍－隣のパネル）。赤色＝心筋ミオシン；黄色－緑色＝核のヨウ化プロピジウム（ＰＩ）標識；青色－マゼンタ＝Ｉ型およびＩＩＩ型コラーゲン）。図１３Ｃは、処置ＭＩ誘導マウスおよび未処置ＭＩ誘導マウスにおける致死率および心筋再生を示すグラフである（サイトカイン処置梗塞マウス、ｎ＝１５；未処置梗塞マウス、ｎ＝５２。対数順位検定：ｐ＜０．０００１）。

【図１４】図１４は、梗塞サイズの定量測定値を示すグラフである（梗塞または疑似手術の２７日後に解剖した疑似手術マウス（ＳＯ、ｎ＝９）、梗塞非処置マウス（ＭＩ、ｎ＝９）、およびサイトカイン処置マウス（ＭＩ－Ｃ、ｎ＝１１）の左心室自由壁（ＬＶＦＷ）における総筋細胞数。損失筋細胞の割合は梗塞サイズに等しい。Ｘ±ＳＤ、＊ｐ＜０．０５でＳＯに対して）。

【図１５】図１５Ａ～Ｃは、心筋梗塞、心臓構造、および心機能の局面から比較するグラフである（図１５Ａ～Ｃは、手術の２７日後の解剖時のＬＶ寸法を示す。疑似手術マウス

（ＳＯ、ｎ＝９）、非処置梗塞マウス（ＭＩ、ｎ＝９）、およびサイトカイン処置梗塞マウス（ＭＩ－Ｃ、ｎ＝１０））。図１５Ｄは心エコー検査によるＥＦを示す（ＳＯ、ｎ＝９；ＭＩ、ｎ＝９;およびＭＩ－Ｃ、ｎ＝９）。図１５Ｅ～Ｍは、ＳＯ（ｅ～ｇ）、ＭＩ（ｈ～ｊ）、およびＭＩ（ｋ～ｍ）のＭモード心エコー図を示す（新たに形成された収縮心筋（矢印））。図１５Ｎは、壁ストレスを示すグラフである。ＳＯ（ｎ＝９）、ＭＩ（ｎ＝９）、およびＭＩ－Ｃ（ｎ＝９）（結果は平均±ＳＤである。＊、＊＊はそれぞれｐ＜０．０５でＳＯおよびＭＩに対する）。

【図１６】図１６Ａ～Ｇは、心筋梗塞、心臓構造、および心室機能の局面を示すグラフである（図１６Ａ～Ｄは、ＳＯ（ｎ＝９）、ＭＩ（ｎ＝９）、およびＭＩ－Ｃ（ｎ＝９）における心エコー検査によるＬＶＥＳＤ（ａ）、ＬＶＥＤＤ（ｂ）、ＰＷＳＴ（ｃ）、およびＰＷＤＴ（ｄ）を示す。図１６Ｅ～Ｇは、ＳＯ（ｎ＝９）、ＭＩ（ｎ＝９）、およびＭＩ－Ｃ（ｎ＝１０）における解剖時剖検による壁厚（ｅ）、腔径（ｆ）、および長軸（ｇ）を示す。＊、＊＊はそれぞれｐ＜０．０５でＳＯおよびＭＩに対する）。図１６Ｈ～Ｐは、ＳＯ（ｈ～ｊ）、ＭＩ（ｋ～ｍ）、およびＭＩ－Ｃ（ｎ～ｐ）の二次元（２Ｄ）画像およびＭモード追跡を示す。

【図１７】図１７（図１７Ａ～Ｄ）は、心室機能の局面を示すグラフである（図１７Ａ～Ｄは、梗塞または疑似手術の２７日後に解剖した麻酔下のマウスにおけるＬＶ血行動態を示す。ＳＯ（ｎ＝９）、ＭＩ（ｎ＝９）、およびＭＩ－Ｃ（ｎ＝１０）。記号および統計は図１３を参照）。

【図１８】図１８Ａ～Ｅは、心筋再生の局面のグラフである（図１８Ａは、ＭＩおよびＭＩ－Ｃにおける２７日後のＬＶＦＷ内の組織の細胞を、残留生存心筋（Ｒｅ）、損失心筋（Ｌｏ）、新形成心筋（Ｆｏ）に分類して示す。ＳＯは無梗塞心筋。図１８Ｂは、残余心筋の細胞肥大の量を示す。図１８Ｃは、再生心筋における増殖細胞を示す。ＢｒｄＵおよびＫｉ６７で標識された筋細胞（Ｍ）、ＥＣ、およびＳＭＣ。ｎ＝１１。＊、＊＊はｐ＜０．０５でＭおよびＥＣに対する。図１８Ｄ～Ｅは、形成された心筋内の筋細胞の容積、数（ｎ＝１１）、およびクラス分布（バケツサイズ、１００μｍ^3；ｎ＝４，４００）を示す。図１８Ｆ～Ｈは、ＴＥＲ－１１９標識赤血球膜（緑色蛍光）と共に細動脈を示す、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真であり、ＳＭＣにおいて、青色蛍光＝核のＰＩ染色、赤色蛍光＝α－平滑筋アクチンである（図１８Ｆは倍率８００倍である。図１８Ｇ～Ｈは倍率１，２００倍である）。

【図１９】図１９（図１９Ａ～Ｄ）は、Ｋｉ６７（Ａ、Ｂ）およびＢｒｄＵ（Ｃ、Ｄ）に対する抗体と一緒にインキュベートした、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図１９Ａは心筋ミオシンによる筋細胞の標識を示す。核の明色蛍光はＰＩおよびＫｉ６７の組合せを反映している。倍率は８００倍である。図１９Ｂはα－平滑筋アクチンによるＳＭＣの標識を示す。核の明色蛍光はＰＩおよびＫｉ６７の組合せを反映している。倍率は１，２００倍である）。図１９Ｃは、α－平滑筋アクチンによるＳＭＣの標識を示す。核の明色蛍光はＰＩとＢｒｄＵの組合せを反映している。倍率は１，２００倍である。図１９Ｄは，形成心筋におけるＶＩＩＩ因子によるＥＣの標識を示す。核の明色蛍光はＰＩとＢｒｄＵの組合せを反映している。倍率は１，６００倍である。

【図２０】図２０（図２０Ａ～Ｆ）は、分化心臓細胞のマーカーを示す、ＭＩ誘導マウス由来の組織片の写真である（図２０Ａは、ネスチンによる筋細胞の標識を示すよう染色されている（黄色）。赤色蛍光は心筋ミオシンを示す。倍率は１，２００倍である。図２０Ｂは、デスミンの標識を示すよう染色されている（赤色）。倍率は８００倍である。図２０Ｃは、コネキシン４３の標識を示すよう染色されている（緑色）。赤色蛍光は心筋ミオシンを示す。倍率は１，４００倍である。図２０ＤはＶＥ－カドヘリンを示し、黄－緑色蛍光はｆｌｋ－１によるＥＣの標識を反映している（矢印）。倍率は１，８００倍である。図２０Ｅは、ＥＣにおけるＶＩＩＩ因子を示す赤色蛍光を示し、黄－緑色蛍光はｆｌｋ－１によるＥＣの標識を反映している（矢印）。倍率は１，２００倍である。図２０Ｆは、ｆｌｋ－１によりＳＭＣ細胞質を標識する緑色蛍光と、ｆｌｋ－１によって標識された内膜を示す。赤色蛍光はα－平滑筋アクチンを示す。青色蛍光は核のＰＩ標識を示す。倍

率は８００倍である）。
【図２１】図２１Ａ～ＣはＭＩ誘導マウス由来の組織片を示す（図２１Ａは、明色蛍光を使用して核のＰＩ標識とＣｓｘ／Ｎｋｘ２．５の組合せを示す。倍率は１，４００倍である。図２１Ｂは、明色蛍光を使用して核のＰＩ標識とＧＡＴＡ－４の組合せを示す。倍率は１，２００倍である。図２１Ｃは、明色蛍光を使用して核のＰＩ標識とＭＥＦ２の組合せを示す。倍率は１，２００倍である（赤色蛍光は心筋ミオシン抗体染色を示し、青色蛍光は核のＰＩ標識を示す。Ｃｓｘ／Ｎｋｘ２．５、ＧＡＴＡ－４、およびＭＥＦ２によって標識された筋細胞核の画分はそれぞれ６３±５％（抽出核＝２，７９０；ｎ＝１１）、９４±９％（抽出核＝２，８１０；ｎ＝１１）、および８５±１４％（抽出核＝３，０９０；ｎ＝１１）であった。）。
【図２２】図２２Ａ～Ｌは、正常、増殖因子処置、および未処置梗塞心臓における心臓原始細胞を示す共焦点顕微鏡写真である。図２２Ａ～Ｆは、疑似手術マウス由来の心房心筋の断片を示す。図２２ＡとＢ、図２２ＣとＤ、図２２ＥとＦはそれぞれ心房心筋の同じ領域を異なる染色で示す一対の顕微鏡写真である。ｃ－Ｍｅｔ（２２Ａ、黄色）はｃ－ｋｉｔ^{POS}（２２Ｂ、緑色）細胞中で検出される（２２Ｂ、黄色－緑色）。同様に、ＩＧＲ－１Ｒ（２２Ｃ、黄色）はＭＤＲＩ^{POS}（２２Ｄ、緑色）細胞中で発現される（２２Ｄ、黄色－緑色）。ＭＤＲ１^{POS}（２２Ｆ、緑色）細胞においてｃ－Ｍｅｔ（２２Ｅ、赤色）とＩＧＲ－１Ｒ（２２Ｅ、黄色）の共存が見られる（２２Ｆ、赤色－黄色－緑色）。矢印は、ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞中のｃ－ＭｅｔおよびＩＧＲ－１Ｒを指す。筋細胞細胞質は赤－紫色で染色され、心筋ミオシンを含む。２２Ｇ：黄線は、増殖因子処置されたマウスにおけるアポトーシス筋細胞を含む梗塞心筋（ＭＩ）（明色核、ＰＩおよびヘアピン形１）を、生存筋細胞を含む境界域（ＢＺ）（青色核、ＰＩのみ）から分離している。生存ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（青色核、ＰＩ；ｃ－ｋｉｔ、緑色）がＭＩおよびＢＺに存在する（矢印）。筋細胞細胞質は赤色に染色され、心筋ミオシンを含む。２２Ｈ：黄線は、増殖因子処置されたマウスにおける壊死筋細胞を含むＭＩ（明色核、ＰＩおよびヘアピン形２）を、生存筋細胞を含むＢＺ（青色核、ＰＩのみ）から分離している。生存ＭＤＲ１^{POS}細胞（青色核、ＰＩ；ＭＤＲ１、緑色）がＭＩおよびＢＺに存在する（矢印）。筋細胞細胞質は赤色に染色され、心筋ミオシンを含む）。２２Ｉおよび２２Ｊ：２匹の未処置マウスの梗塞領域においてアポトーシス筋細胞（２２Ｉおよび２２Ｊ、明色核、ＰＩおよびヘアピン形１）およびｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（２２Ｉ、緑色環）およびＭＤＲ１^{POS}細胞（２２Ｊ、緑色環）がアポトーシスとなっている（２２Ｉおよび２２Ｊ、明色核、ＰＩおよびヘアピン形１；矢印）。生存細胞は青色核を持つ（ＰＩのみ）。生存ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞が梗塞心筋中に存在する（２２Ｉ、青色核、ＰＩのみ；矢頭）。筋細胞細胞質は赤色に染色され、心筋ミオシンを示す。２２Ｋおよび２２Ｌ：増殖因子処置マウスの梗塞心筋（黄点はアポトーシス核である）中に循環ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（２２Ｋ、緑環；矢印）およびＭＤＲ１^{POS}細胞（２２Ｌ、緑環；矢印）が存在する。ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（２２Ｋ）およびＭＤＲ１^{POS}細胞（２２Ｌ）中の明色蛍光は核のＫｉ６７標識に相当する。２２Ａ～２２Ｌ、棒線＝１０μｍ。２２Ｍおよび２２Ｎは、手術の７～８時間後および増殖因子（処置）または生理食塩水（ＳＯ；未処置）投与の２～３時間後に解剖した疑似手術マウス（ＳＯ）、梗塞処置マウス（処置）、および梗塞未処置マウス（未処置）における種々の心臓領域中の生存または死滅したｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（２２Ｍ）およびＭＤＲ１^{POS}細胞（２２Ｎ）の分布を示すグラフである。略語は次の通りである：Ａ、心房；ＬＶ、左心室；Ｒ、梗塞から離れた生存心筋；Ｂ、梗塞に隣接する生存心筋；Ｉ、生存不可能な梗塞心筋。２２Ｍおよび２２Ｎの結果は平均±ＳＤで示す。＊、＊＊はそれぞれｐ＜０．０５でＳＯおよび処置に対することを示す。
【図２３】図２３Ａ～Ｂは、梗塞サイズと左心室血行動態の評価を示すグラフである。結果は平均±ＳＤで示す。＊、＊＊はそれぞれｐ＜０．０５で疑似手術マウス（ＳＯ）および未処置梗塞マウス（ＭＩ）に対する値であることを示す。略語は次の通りである：ＭＩ－Ｔ、処置梗塞マウス；ＬＶ、左心室および隔膜。２３Ａ：残存心筋における心肥大および壊死域の経時的治癒が梗塞サイズに及ぼす影響を最小化するため、左心室および隔膜中

の筋細胞損失によって梗塞寸法を測定した。この測定は、生存組織中の反応性肥大および瘢痕形成を伴う壊死心筋の収縮とは無関係である（８７）。２３Ｂ：ＬＶ血行動態の評価は、ＬＶ拡張終期圧、ＬＶ発生圧力、ＬＶ＋ｄＰ／ｄｔ、およびＬＶ－ｄＰ／ｄｔから得たデータによって表される。２３Ｃから２３Ｈは、未処置マウス（２３Ｃおよび２３Ｄ）および２匹の処置マウス（２３Ｅから２３Ｈ）の左心室の大規模梗塞を示す共焦点顕微鏡写真である。２３Ｃ、２３Ｅ、および２３Ｇ（棒線＝１ｍｍ）においてゲートによって規定される領域は２３Ｄ、２３Ｆ、および２３Ｈ（棒線＝０．１ｍｍ）において高倍率で示される。２３Ｃおよび２３Ｄにおいて、心筋再生の欠如が壁の梗塞域（矢印）中のＩ型およびＩＩＩ型コラーゲン（青色）の蓄積によって示されている。残余筋細胞および炎症細胞の核が明らかである（緑色、ＰＩ）。生存筋細胞薄層が心外膜下に存在する（赤色、心筋ミオシン）。２３Ｅから２３Ｈにおいて、筋細胞再生が心筋ミオシン抗体の赤色蛍光によって示されている。梗塞領域においてＩ型およびＩＩＩ型コラーゲン（青色、矢頭）が小フォーカスとして検出されている。核は黄－緑色である（ＰＩ）。略語は次の通りである：ＩＳ、心室間隔膜；ＭＩ、心筋梗塞；ＲＶ、右心室。

【図２４】図２４は、冠状動脈結紮前および結紮の１５日後の単一マウス由来の心エコー検査の結果を示す。共焦点顕微鏡検査は、同じ心臓の断面を示す。２４Ａは冠状動脈結紮前のベースライン心エコー検査結果を示す。２４Ｂおよび２４Ｃは、２４Ａおよび２４Ｄで評価した心臓の断面を低倍率（２４Ｂ、棒線＝１ｍｍ）および高倍率（２４Ｃ、棒線＝０．１ｍｍ）で示す共焦点顕微鏡写真である。略語は次の通りである：ＲＶ、右心室；ＩＳ、心室間隔膜；ＭＩ、心筋梗塞。２４Ｄは梗塞の１５日後の同じ心臓の収縮機能の心エコー検査資料を示す。２４Ｅは駆出率を示すグラフであり、結果を平均±ＳＤで示す。＊、＊＊はそれぞれｐ＜０．０５で疑似手術マウス（ＳＯ）および未処置梗塞マウス（ＭＩ）に対する。ＭＩ－Ｔは処置梗塞マウスを示す。

【図２５】図２５Ａ～Ｆは、再生筋細胞の特性を詳細に表す共焦点顕微鏡写真である。これらの特性は２５Ｇ～Ｊのグラフに定量化される。２５Ａおよび２５Ｂは、酵素作用により解離した再生部分由来筋細胞（２５Ａ）および増殖因子で処置した心臓の梗塞心室の残存心筋（２５Ｂ）を示す。２５Ａは、小さな筋細胞（赤色、心筋ミオシン）、明色核（ＰＩおよびＢｒｄＵ）、および青色核（ＰＩのみ）を示すよう染色してある。２５Ｂは、大きな肥大筋細胞（赤色、心筋ミオシン）、明色核（ＰＩおよびＢｒｄＵ）、および青色核（ＰＩのみ）を示す。２５Ａおよび２５Ｂにおいて、棒線は５０μｍである。増殖因子で処理したマウスにおける梗塞後の新たな筋細胞（２５Ｃおよび２５Ｄ）および残余筋細胞（２５Ｅおよび２５Ｆ）の機械的特性を示す。Ｒは弛緩状態の筋細胞を指し、Ｃは収縮状態を指す。細胞短縮（Ｇ）、短縮速度（Ｈ）、ピーク短縮時間（Ｉ）、および５０％再伸長時間（Ｊ）に及ぼす刺激の影響を、Ｎ（新しい小筋細胞）およびＳ（残余肥大筋細胞）に対する結果で示す。結果は平均±ＳＤで表す。＊はｐ＜０．０５でＳに対する値であることを示す。

【図２６】図２６は、成熟筋細胞の種々のマーカーを示す共焦点顕微鏡写真の一部である（２６Ａから２６Ｎ、棒線＝１０μｍ）。２６Ａから２６Ｆにおいては、再生心筋の組織片の筋細胞における、核のＢｒｄＵ標識を２６Ａ、２６Ｃ、および２６Ｅに緑色の着色で示すと共に、ネスチン（２６Ｂ、赤色）、デスミン（２６Ｄ、赤色）、心筋ミオシン（２６Ｆ、赤色）の局在化を示す。核は、２６Ｂ、２６Ｄ、２６ＦにおいてはＰＩのみで標識され（青色）、２６Ｂ、２６Ｄ、および２６ＦにおいてはＢｒｄＵおよびＰＩで一緒に標識されている（明色）。２６Ｇから２６Ｎは、発生心筋の断片（２６Ｇから２６Ｊ）および単離筋細胞（２６Ｋから２６Ｎ）におけるコネキシン４３（２６Ｇ、２６Ｈ、２６Ｋ、および２６Ｌ、黄色）およびＮ－カドヘリン（２６Ｉ、２６Ｊ、２６Ｍ、および２６Ｎ、黄色）の同定を示す。筋細胞は心筋ミオシン（２６Ｈ、２６Ｊ、２６Ｌ、および２６Ｎ、赤色）によって染色されており、核はＢｒｄＵのみ（２６Ｇ、２６Ｉ、２６Ｋ、および２６Ｍ、緑色）、ＰＩのみ（２６Ｈおよび２６Ｊ、青色）、およびＢｒｄＵおよびＰＩ（２６Ｈ、２６Ｊ、２６Ｌ、および２６Ｎ、明色）によって染色されている。

【図２７】図２７は、新しく形成された冠状脈管系を示す一連の共焦点顕微鏡写真である

。図２７Ａから図２７Ｄにおいては、ＴＥＲ－１１９標識赤血球膜（緑色）、核のＰＩ染色（青色）、および平滑筋細胞のα－平滑筋アクチン染色（赤色）を用いて細動脈を示す。全ての顕微鏡写真において、棒線は１０μｍである。

【図２８】図２８：免疫磁気ビーズ（ａ）とＦＡＣＳ（ｂ）を用いて得られた心筋Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞の同定と成長を示す。ａ，ｂ．ＮＳＣＭ中のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は、心臓細胞系の細胞性タンパク質に対して陰性を示し、核はＰＩ（青色）で染色され、ｃ－ｋｉｔ（緑色）はｃ－ｋｉｔ抗体によって染色されている。ｃ－ｆ．Ｐ１のＤＭ中、培養細胞を核のＮｋｘ２．５（ｃ）、ＭＥＦ２（ｄ）、ＧＡＴＡ－４（ｅ）、およびＧＡＴＡ－５（ｆ）標識における紫色蛍光によって示す。ｇ，ｈ．ＮＳＣＭによって選択され低密度に平板培養された幹細胞（ｇ）は個別の小さなコロニーを形成した（ｈ）。棒線＝１０μｍ。

【図２９】クローン原性細胞の自己再生および多能性。ａ．クローン中のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞：核＝青色、ｃ－ｋｉｔ＝緑色（矢頭）。ｂ．３個のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞のうち２つ（緑色、矢頭）は核（青色）内にＫｉ６７（紫色、矢印）を発現した。ｃ，ｄ．Ｋｉ６７陽性（ｃ）分裂中期染色体（赤色）。ｄ．ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（緑色）中のＫｉ６７およびＰＩ（紫色）で標識された分裂中期染色体。ｅ－ｈ．クローン中、Ｍ（ｅ）、ＥＣ（ｆ）、ＳＭＣ（ｇ）、およびＦ（ｈ）の細胞質（赤色）をそれぞれ心筋ミオシン、ＶＩＩＩ因子、α－平滑筋アクチン、およびビメンチンで染色した。核＝青色。Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（緑色、矢頭）が存在する。棒線＝１０μｍ。

【図３０】クローン原性細胞および球状クローン。ａ．ＮＳＣＭにおける懸濁液中の球状クローン（矢頭）。ｂ．クローン内のｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（緑色、矢頭）および陰性細胞のクラスター。核＝青色。ｃ．充填細胞核（青色）および多量のネスチン（赤色）を含む球状体。ｄ．球状体内の非損傷ネスチン（赤色）の蓄積。核＝青色。ｅ．球の外に移動する細胞を伴うＤＭにおいて平板培養された球状体。ｆ－ｈ．球状体の外へ移動して分化するＭ（ｆ）、ＳＭＣ（ｇ）、およびＥＣ（ｈ）は、細胞質が（赤色）心筋ミオシン、α－平滑筋アクチン、およびＶＩＩＩ因子によってそれぞれ染色された。核＝青色。棒線＝１０μｍ。

【図３１】心筋修復。ａ－ｃ．梗塞処置ラット（ＭＩ）における再生心筋（ａ，ｂ、矢頭）。新たなＭ＝ミオシン（赤色）；核＝黄－緑色。注入部位（矢印）。ｃ．梗塞未処置ラットにおける心筋瘢痕（青色）。＊残余筋細胞。ｄ－ｌ．Ｍ（ｆ、ミオシン）および冠状血管（ｉ、ＥＣ＝ＶＩＩＩ因子；ｌ．ＳＭＣ＝α－平滑筋アクチン）はＢｒｄＵ（緑色）陽性核（ｅ、ｈ、ｋ）によって同定される。青色核＝ＰＩ（ｄ、ｇ、ｊ）。ｍ－ｔ．２０日後の筋細胞（ｏ、ｐ、ｓ、ｔ）は１０日後の筋細胞（ｍ、ｎ、ｑ、ｒ）より分化が進んでいる。ｍ－ｐ：コネキシン４３＝黄色（矢頭）。ｑ－ｔ：Ｎ－カドヘリン＝黄色（矢頭）；ミオシン＝赤色。核＝青色；ＢｒｄＵ＝緑色（矢印）。棒線＝１ｍｍ（ａ）、１００μｍ（ｂ、ｃ）、１０μｍ（ｄ－ｔ）。

【図３２】新たに生成された筋細胞。ａ．修復心筋バンドから酵素作用により解離した細胞。心筋ミオシン＝赤色；ＢｒｄＵ＝緑色；核＝青色。ｂ－ｅ．新たな筋細胞の分化。コネキシン４３＝黄色（ｂ、ｃ）；Ｎ－カドヘリン＝黄色（ｄ、ｅ）。心筋ミオシン＝赤色；ＢｒｄＵ＝緑色；核＝青色。棒線＝１０μｍ。

【図３３】筋細胞の機械的特性。ａ－ｄ．処置ラットにおいて梗塞後の再生心筋および残存心筋から得られた新たな筋細胞（Ｎ）および残余筋細胞（Ｓ）。Ｒ＝弛緩、Ｃ＝収縮。ｅ－ｈ．Ｎ筋細胞（ｅ、ｇ）およびＳ筋細胞（ｆ、ｈ）の細胞短縮および短縮速度に及ぼす刺激の効果。ｉ－ｌ．結果は平均±ＳＤで示す。＊はＰ＜０．０５でＳに対する。

【図３４】ラット心臓における原始細胞。２２月齢のＦｉｓｃｈｅｒラット由来の左心室心筋の断片。Ａ．ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）の青色蛍光によって核を示す。Ｂ．緑色蛍光はｃ－ｋｉｔ陽性細胞を表す。Ｃ．ＰＩとｃ－ｋｉｔの組合せを緑色蛍光および青色蛍光によって示す。筋細胞細胞質はα－筋節アクチン抗体染色の赤色蛍光によって識別される。共焦点顕微鏡写真。棒線＝１０μｍ。

【図３５】ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞のＦＡＣＳ分析。ｃ－ｋｉｔ発現レベル対細胞ＤＮＡを

示す、雌Ｆｉｓｃｈｅｒ３４４ラットの左心室から得た心臓細胞の二変量分布。細胞をＰＢＳ中に１０^{６}細胞／ｍｌの濃度で懸濁させた。ＥＬＩＴＥ　ＥＳＰフローサイトメーター／細胞ソーター（Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｉｎｃ．）において、ＵＶ光を発光するヘリウムーカドミウムレーザと組合せたアルゴンイオンレーザ（４８８ｎｍで発光）を用い、細胞蛍光を測定した。矢印は、最低ｃ－ｋｉｔレベルを表す閾値を示す。ＦＡＣＳ分析のため、ｒーフィコエリトリン（Ｒ－ＰＥ）結合ラットモノクローナルｃ－ｋｉｔ抗体（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）と一緒に細胞をインキュベートした。Ｒ－ＰＥイソタイプ標準を陰性対照として使用した。

【図３６】心筋ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞の回収法（Ａ）およびＮＳＣＭにおける心筋ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞の培養（Ｂ）。Ａ．ｃ－ｋｉｔ表面レセプターを発現する未分化細胞をｃ－ｋｉｔ抗体に暴露し、次いでＩｇＧ抗体で被覆した免疫磁気ビーズに暴露した。ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞を磁気によって回収し、ＮＳＣＭ中で培養した。Ｂ．免疫磁気ビーズをｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞の表面に付着させる（矢頭）。ｃ－ｋｉｔ^{ＮＥＧ}細胞の不在は明らかである。位相差顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図３７】免疫磁気ビーズを用いて回収された、新たに単離された細胞におけるｃ－ｋｉｔタンパク質。ｃ－ｋｉｔ抗体の緑色蛍光によってｃ－ｋｉｔタンパク質を示す。細胞に付着したビーズを赤色蛍光で示す。青色蛍光は核のＰＩ標識を反映している。即ち、ビーズを用いて選択された細胞はｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}であることが分かった。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図３８】心筋細胞分化の転写因子。ビーズを除去した後、またはＦＡＣＳ分離の直後、塗抹標本を作製し、Ｎｋｘ２．５、ＭＥＦ２、およびＧＡＴＡ－４を検出するため、細胞を染色した。パネルＡ～Ｃの青色蛍光は核のＰＩ標識に相当する。核内の紫色蛍光はＮｋｘ２．５（Ａ）、ＭＥＦ２（Ｂ）、およびＧＡＴＡ－４（Ｃ）の発現を反映している。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図３９】ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞および骨格筋分化の転写因子。パネルＡ～Ｃはｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞を示す（緑色蛍光、ｃ－ｋｉｔ抗体；青色蛍光、ＰＩ標識）。パネルＤ～Ｆは、ＭｙｏＤ（Ｄ）、ミオゲニン（Ｅ）、およびＭｙｆ５（Ｆ）に対する陽性対照（Ｃ２Ｃ１２筋芽細胞系）を核内の緑色蛍光で示す（赤色蛍光、ＰＩ標識）。ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞は上記骨格筋転写因子に対して陰性を示した。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図４０】分化培地（ＤＭ）におけるｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞の成長。ｃ－ｋｉｔ陽性細胞を平板培養して得られる単層集密細胞。ＤＮａｓｅＩを用いて細胞を緩やかに消化することにより免疫磁気ビーズを除去した。この過程で、ビーズと抗ＩｇＧ抗体の間の短鎖ＤＮＡリンカーが分解される。位相差顕微鏡検査。棒線＝２０μｍ。

【図４１】ＤＭにおける循環細胞核。領域内に含まれる大半の核内でＫｉ６７（紫色蛍光）が発現された。青色蛍光は核のＰＩ標識を反映している。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図４２】ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}由来細胞の成長率。Ｐ２およびＰ４の細胞の指数的成長曲線。$ｔ_{Ｄ}$．細胞数倍増に要する時間。各点は５つまたは６つの独立測定点に対応する。垂線はＳＤ。

【図４３】心筋Ｌｉｎ$^{－}$ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}細胞の同定および成長。Ｐ３のＤＭにおいて、Ｍ（Ａ）、ＥＣ（Ｂ）、ＳＭＣ（Ｃ）、およびＦ（Ｄ）の細胞質（緑色）を、心筋ミオシン、ＶＩＩＩ因子、α－平滑筋アクチン、およびビメンチン（ＶＩＩＩ因子陰性）でそれぞれ染色した。核＝赤色。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図４４】神経系細胞の細胞質マーカー。パネルＡ～ＣはＰ１のＤＭにおける細胞を示す（赤色蛍光、α－筋節アクチン；青色蛍光、ＰＩ標識）。パネルＤ～Ｆは、細胞質（青色蛍光、ＰＩ標識）中のＭＡＰ１ｂ（Ｄ．ニューロン２Ａ細胞系）、神経フィラメント２００（Ｅ．ニューロン２Ａ細胞系）、およびＧＦＡＰ（Ｆ．ＩＩＩ型星状細胞、クローンＣ８－Ｄ３０）に対する陽性対照を緑色蛍光で示す。ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}由来細胞は上記神経タンパク質に対して陰性を示した。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図４５】線維芽細胞の細胞質マーカー。パネルＡ～Ｃは、ＮＳＣＭにおける未分化細胞

の小コロニーを示す（緑色蛍光、ｃ－ｋｉｔ；青色蛍光、ＰＩ標識）。パネルＤ～Ｆは、細胞質（青色蛍光、ＰＩ標識）中のフィブロネクチン（Ｄ）、Ｉ型プロコラーゲン（Ｅ）、およびビメンチン（Ｆ）に対する陽性対照（ラット心線維芽細胞）を赤色蛍光で示す。ｃ－ｋｉｔ^{POS}由来細胞は上記線維芽タンパク質に対して陰性を示した。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図４６】ＦＡＣＳ単離ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞：クローン原性細胞の多能性。クローンにおいて、Ｍ（Ａ）、ＥＣ（Ｂ）、ＳＭＣ（Ｃ）、およびＦ（Ｄ）の細胞質を、心筋ミオシン、ＶＩＩＩ因子、α－平滑筋アクチン、およびビメンチンでそれぞれ染色した。青色蛍光、核のＰＩ標識。Ｌｉｎ$^{-}$ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（緑色蛍光、矢頭）が存在する。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図４７】分化早期における心臓細胞系。Ａ，Ｂ．分化早期における細胞の細胞質中のネスチン単独の発現（緑色蛍光）。Ｃ，Ｄ．発達中筋細胞におけるネスチン（緑色、Ｃ）および心筋ミオシン（赤色、Ｄ）の発現。Ｅ，Ｆ．発達中内皮細胞（矢頭）におけるネスチン（緑色、Ｅ）およびＶＩＩＩ因子（赤色、Ｆ）の発現。Ｇ，Ｈ．発達中平滑筋細胞（矢頭）におけるネスチン（緑色、Ｇ）およびα－平滑筋アクチン（赤色、Ｈ）の発現。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図４８】梗塞サイズおよび心筋修復。Ａ．１０日後、冠状動脈閉塞の結果、未処置ラット（ＭＩ）および処置ラット（ＭＩ－Ｔ）において左心室内の筋細胞数の４９％および５３％がそれぞれ失われた。２０日後、冠状動脈閉塞の結果、未処置ラット（ＭＩ）および処置ラット（ＭＩ－Ｔ）において左心室内の筋細胞数の５５％および７０％がそれぞれ失われた。ＳＯ、疑似手術動物。＊Ｐ＜０．０５でＳＯに対して。†Ｐ＜０．０５でＭＩに対して。Ｂ．細胞移植処置をした動物（ＭＩ－Ｔ）において冠状動脈閉塞の１０日後および２０日後に、壁の梗塞領域内に新たに形成された心筋の比率。＊Ｐ＜０．０５で１０ｄに対する。Ｃ，Ｄ．１０日後および２０日後に細胞移植によって新たに形成された心筋の量（Ｆ）を形態計測によって測定した。梗塞後の残存心筋（Ｒ）および損失心筋（Ｌ）をそれぞれ斜線および斜交線で示す。再生組織（Ｆ）により残存心筋（Ｒ＋Ｆ）および損失心筋（Ｌ－Ｆ）は同じ量だけ増加および減少した。結果として、細胞移植処置された両群のラットにおいて心筋修復により梗塞サイズが減少した。結果は平均±ＳＤで示す。＊Ｐ＜０．０５でＭＩに対する。†Ｐ＜０．０５でＭＩ－ＴにおけるＬｏおよびＦｏに対する。

【図４９】心筋修復。Ａ，Ｂ．２つの梗塞処置心臓における再生心筋バンド。赤色蛍光は、新たに形成された筋細胞の心筋ミオシン抗体染色に相当する。黄－緑色蛍光は核のＰＩ標識を反映している。青色蛍光（矢頭）は、壁の梗塞領域におけるコラーゲン蓄積の小フォーカスである。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１００μｍ。

【図５０】毛細血管の新形成。毛細血管プロファイルにおける移植細胞の分化を内皮細胞のＢｒｄＵ標識によって同定した。Ａ．核のＰＩ標識（青色）。Ｂ．核のＢｒｄＵ標識（緑色）。Ｃ．毛細血管内皮（赤色）およびＢｒｄＵによって標識された内皮細胞核（青色および緑色）。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。

【図５１】再生心筋の容積組成。１０日後から２０日後の間、筋細胞（Ｍ）、毛細血管（Ｃａｐ）、および細動脈（Ａｒｔ）の容積画分はそれぞれ２５％、６２％、および１４０％増加した。反対に、Ｉ型コラーゲン（Ｃ－Ｉ）およびＩＩＩ型コラーゲン（Ｃ－ＩＩＩ）の容積比はそれぞれ７３％および７１％減少した。結果は平均±ＳＤで示す。＊Ｐ＜０．０５で１０日後に対する。

【図５２】再生心筋における細胞増殖。１０日後から２０日後の間、Ｋｉ６７によって標識された筋細胞（Ｍ）、内皮細胞（ＥＣ）、および平滑筋細胞（ＳＭＣ）の画分はそれぞれ６４％、６３％、および５９％減少した。結果は平均±ＳＤで示す。＊Ｐ＜０．０５で１０日後に対する。

【図５３】ＢｒｄＵ標識による再生筋細胞の同定。Ａ，Ｄ．ＰＩの青色蛍光によって核を示す。Ｂ．Ｅ．緑色蛍光は核のＢｒｄＵ標識を表す。Ｃ，Ｆ．α－心筋アクチニン（Ｃ）またはα－筋節アクチン（Ｆ）の赤色蛍光によって筋細胞細胞質が認識される。新たな筋

細胞においては、濃青色および淡青色の蛍光は筋細胞核のＰＩおよびＢｒｄＵ標識の組合せを反映している。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。
【図５４】新たに形成された筋細胞の数および容積に及ぼす時間の影響。１０日後から２０日後にかけて、発達中の筋細胞のサイズは有意に増加した。しかしながら、細胞数は実質的に一定を保った。サイズ分布は１０日後より２０日後のほうが広がっていた。
【図５５】新たに形成された冠状脈管系の発達に及ぼす時間の影響。新たに形成された細動脈（Ａｒｔ）および毛細血管（Ｃａｐ）の密度値は１０日後から２０日後にかけて有意に増加した。結果は平均±ＳＤで示す。＊Ｐ＜０．０５で１０日後に対する。
【図５６】梗塞心室における残存筋細胞。Ａ，Ｂ．左心室および心室間隔膜の残留生存組織から単離された大きな肥大筋細胞。赤色蛍光は心筋ミオシン抗体染色に相当し、青色蛍光はＰＩ標識に相当する。細胞縁部の黄色蛍光はコネキシン４３（Ａ）およびＮ－カドヘリン（Ｂ）を反映している。共焦点顕微鏡検査。棒線＝１０μｍ。
【図５７】細胞移植および心エコー検査。心筋再生は心室拡張を低減し（Ａ）、壁の残存部分の厚さに影響せず（Ｂ）、心室の梗塞領域の厚さを増加させ（Ｃ）、駆出率を向上させた（Ｄ）。ＳＯ＝疑似手術；ＭＩ＝未処置梗塞；ＭＩ－Ｔ＝処置梗塞。結果は平均±ＳＤで示す。＊Ｐ＜０．０５でＯＳに対する。＊＊Ｐ＜０．０５でＭＩに対する。
【図５８】心エコー検査追跡。未処置梗塞ラット（Ａ，Ｂ）および処置梗塞ラット（Ｃ，Ｄ）の二次元画像およびＭモード追跡。パネルＡおよびＣは冠状動脈閉塞前のベースライン状態に相当する。パネルＤにおいて収縮の再現が明らかである（矢頭）。
【図５９】心室機能および壁ストレス。細胞移植により心室機能が向上し、梗塞後の拡張期壁ストレスの上昇が緩和された。ＳＯ＝疑似手術；ＭＩ＝未処置梗塞；ＭＩ－Ｔ＝処置梗塞；ＬＶＥＤＰ＝左心室拡張終期圧；ＬＶＤＰ＝左心室発生圧力；＋ｄＰ／ｄｔ＝圧力上昇率；－ｄＰ／ｄｔ＝圧力低下率。結果は平均±ＳＤで示す。＊Ｐ＜０．０５でＳＯに対する。＊＊Ｐ＜０．０５でＭＩに対する。
【図６０】正常心筋内細胞移植。Ｐ２で得られたＢｒｄＵ標識細胞を疑似手術ラットに注射した。２０日後、未分化細胞は数個同定されただけであった。Ａ、Ｃ．緑色蛍光は核のＢｒｄＵ標識を表す。Ｂ、Ｄ．筋細胞細胞質がα－筋節アクチンの赤色蛍光によって認識される。ＰＩの青色染色によって核を示す。注入細胞（矢頭）において、明青色蛍光はＰＩおよびＢｒｄＵ標識の組合せを反映している（Ｂ、Ｄ）。共焦点顕微鏡。棒線＝１０μｍ。
【図６１】図６１および図６２：移動および侵入アッセイ。結果は平均±ＳＤで示す。＊は、増殖因子に暴露されなかった細胞からの統計的有意差、即ちＰ＜０．０５を示す。
【図６２】図６１および図６２：移動および侵入アッセイ。結果は平均±ＳＤで示す。＊は、増殖因子に暴露されなかった細胞からの統計的有意差、即ちＰ＜０．０５を示す。
【図６３】マトリックスメタロプロテイナアーゼ活性アッセイ。ゼラチンザイモグラフィから得られたゲルのデジタル写真。
【図６４】増殖因子レセセプターを発現する原始細胞のグラフ。手術の７～８時間後、増殖因子投与（処置）または生理食塩水投与（ＳＯ；処置）の２～３時間後に解剖した、疑似手術（ＳＯ）、梗塞処置（処置）、および梗塞未処置（未処置）の各マウスの心臓の種々の領域におけるｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞上のｃ－ｍｅｔおよびＩＧＦ－１Ｒの分布を示す。測定値は、アポトーシス進行とは無関係に、全てのｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞を含む。略語は次の通りである：Ａ，心房；ＬＶ，左心室；Ｒ，梗塞から遠隔の生存心筋；Ｂ，梗塞に隣接する生存心筋；Ｉ，非生存梗塞心筋。結果は全て平均±ＳＤで示す。
【図６５】循環原始細胞の位置を示すグラフ。手術の７～８時間後および増殖因子（処置）または生理食塩水（ＳＯ，未処置）投与の２～３時間後に解剖した疑似手術（ＳＯ）、梗塞処置（処置済）、および梗塞未処置（未処置）の各マウスの心臓の種々の領域における可視Ｋｉ６７標識ｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞およびＭＤＲ１^{POS}細胞の比率を示す。記号は以下の通りである：Ａ、心房；ＬＶ，左心室；Ｒ，梗塞から遠隔の生存心筋；Ｂ，梗塞に隣接する生存心筋；Ｉ，非生存梗塞心筋。結果は平均±ＳＤで示す。

【図６６】非循環筋細胞（実線）および循環筋細胞（破線；Ｋｉ６７陽性核）におけるＤＮＡ含有量の頻度分布を示すグラフ。新旧両方の筋細胞が２ｎ染色体に相当する量のクロマチンを示した。２ｎを超えるＤＮＡ含有量は循環核に限定された。測定した非循環核は二倍体リンパ球に匹敵する蛍光強度を示した。６００個の新たな筋細胞、１，０００個の旧筋細胞、１，０００個のリンパ球を抽出した。

【図６７】心臓の構造および拡張期負荷に及ぼす心筋梗塞の影響を示すグラフ。結果は平均±ＳＤで示す。＊、＊＊はｐ＜０．０５で疑似手術マウス（ＳＯ）および未処置梗塞マウス（Ｍ１）に対する値であることを示す。ＭＩ－Ｔは処置梗塞マウスを示す。

【図６８】筋細胞サイズの頻度分布を示すグラフ。デスミンおよびラミニン抗体およびＰＩで染色したセクションにおいて新たに形成された筋細胞の容積を測定した。中央に核を有し、縦方向に向いた細胞のみを含めた。各筋細胞において核を通る長さおよび直径を収集し、円筒形と仮定して細胞容積を計算した。各心臓で４００個の細胞を測定した。

【図６９】心臓修復を示すグラフ。疑似手術マウス（ＳＯ）におけるＬＶ容積と、未処置マウス（ＭＩ）においては４２％、処置マウス（ＭＩ－Ｔ）においては６７％の梗塞サイズに基づき、２群の梗塞マウスにおいて、残存が見込まれる心筋（Ｒ）と損失が見込まれる心筋（Ｌ）の容積を計算した（図９）。処置マウスにおいて新たに形成された心筋の容積（Ｆ）を定量化した。心筋生成により、残存心筋容積（Ｒ＋Ｆ）および損失心筋容積（Ｌ－Ｆ）はそれぞれ同じ量だけ増加および低下した。従って、処置マウスにおける梗塞サイズは１５％縮小した。

【図７０】ヒト心臓前駆細胞の単離および培養の顕微鏡写真。心臓細胞増殖のためのヒト心筋試料（ＭＳ）の播種（ＡおよびＢ）。～２週後、細胞クラスター（Ｃ；ビメンチン、緑色）が中央の外植片を包囲している。ｃ－ｋｉｔ（Ｄ；緑色、矢印）、ＭＤＲ１（Ｅ；マゼンタ、矢印）、およびＳｃａ－１様タンパク質（Ｆ；黄色、矢印）に対して陽性の細胞が存在。一部の核はＧＡＴＡ４（Ｅ；白色）およびＭＥＦ２Ｃ（Ｆ；マゼンタ）を発現。小さなｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞（緑色、矢印）と共に、筋細胞（Ｇ；α－筋節アクチン、赤色）、ＳＭＣ（Ｈ；α－ＳＭアクチン、マゼンタ）、ＥＣ（Ｉ；フォン・ヴィレブランド因子、黄色）、および神経フィラメント２００に対して陽性の細胞（Ｊ；白色）が成長細胞内で検出された。

【図７２】ヒトｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞は梗塞心筋を再生する。７２Ａ～Ｃは顕微鏡写真である。７２Ａは、ヒトｃ－ｋｉｔ^{POS}細胞を注射し２１日後に解剖した免疫不全マウスにおける梗塞心臓を示す。大きな横断方向セクションは梗塞（ＭＩ）内の再生心筋バンドを示す。ＢＺは境界域。長方形に含まれる２つの領域は下のパネルに高倍率で示されている。新たに形成された筋細胞内のＡｌｕプローブの局在化が核内の緑色蛍光ドットで示されている。新たに形成された筋細胞はα－筋節アクチン（赤色；矢頭）によって同定される。筋細胞核はヨウ化プロピジウム（青色）によって標識されている。アスタリスクは残余筋細胞を示す。ＢおよびＣ：免疫不全マウス（Ｂ）および免疫抑制ラット（Ｃ）における梗塞およびヒト細胞注射の２１および１４日後の再生心筋の例（矢頭）。新たに形成された筋細胞はα－筋節アクチン（赤色）によって同定される。筋細胞核はＡｌｕ（緑色）およびＢｒｄＵ（白色）で標識されている。アスタリスクは残余マウスおよびラット筋細胞を示す。７２Ｄは、ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色セクションを含み、抽出プロトコルを示す。再生された梗塞心筋におけるヒトＤＮＡの検出に使用されたゲルの写真も示す。ヒト血液（ヒト）および無傷ラット心筋（ラット）を陽性対照および陰性対照として用いた。梗塞心筋におけるラットＭＬＣ２ｖＤＮＡに対するシグナルは壁の心内膜下および／または心外膜下における残余筋細胞の存在を反映している（図７２Ａ～Ｃ参照）。７２ＥとＦ、およびＧとＨは同じ領域を表す顕微鏡写真である。新たに形成された筋細胞（Ｅ～Ｈ；トロポニンＩ、ｑｄｏｔ６５５、赤色）はＧＡＴＡ４（Ｅ；ｑｄｏｔ６０５、白色）およびＭＥＦ２Ｃ（Ｇ；ｑｄｏｔ６０５、黄色）を発現する。ラミニン：ｑｄｏｔ５２５、白色。筋細胞核はＡｌｕで標識されている（ＦおよびＨ；緑色）。コネキシン４３（Ｉ；ｑｄｏｔ６０５、黄色、矢頭）およびＮ－カドヘリン（Ｊ；ｑｄｏｔ６０５、黄色、矢頭）が発生筋細胞間に心筋ミオシン重鎖（ＭＨＣ；ｑｄｏｔ６５５、赤色

）によって検出される。これらの構造体はＡｌｕに対して陽性である。新たに形成された筋細胞の一部において筋節条線が明らかである（Ｅ～Ｊ）。Ａ、Ｂ、Ｅ、Ｆ、Ｉ、Ｊ：細胞移植の２１日後の梗塞免疫不全マウス。Ｃ、Ｄ、Ｇ、Ｈ：細胞移植の１４日後の梗塞免疫抑制ラット。

【図７３】７３Ａ～ＦおよびＨは微小冠状脈管系および細胞融合を示す顕微鏡写真である。ＳＭＣ層を伴うヒト冠状細動脈（Ａ～Ｃ；α－ＳＭアクチン、ｑｄｏｔ６５５、赤色）。Ｃの細動脈の内膜はフォン・ヴィレブランド因子（ｑｄｏｔ６０５、黄色）でＤに示される。ＥおよびＦ：ヒト毛細血管（フォン・ヴィレブランド因子、ｑｄｏｔ６０５、黄色）。核はＡｌｕ（Ａ～Ｆ；緑色）で標識されている。７３Ｇは、ヒト心筋における血管形成の程度を示すグラフである。結果は平均±ＳＤで示す。Ｈ：梗塞の中間部における再生筋細胞および血管中のヒトＸ染色体（白色ドット；矢頭）。再生ヒト筋細胞近辺の境界域にある筋細胞中にマウスＸ染色体（マゼンタドット；矢印）が存在する。核は２以上のヒトＸ染色体を示さず、細胞融合は除外される。

【図７４】心筋再生および心機能。７４Ａ～Ｃは貫壁性梗塞を示す顕微鏡写真である。未処置ラットにおける貫壁性梗塞を７４Ａに示す（矢頭）。長方形内の領域は下のパネルに高倍率で示されている。核のない死滅筋細胞（死滅、α－筋節アクチン、赤色）。接続組織細胞核（赤色）。心エコー図は、壁の梗塞領域における収縮の欠如を示す（矢印）。Ｂ：処置ラットにおける貫壁性梗塞（矢頭）。長方形内の領域は下のパネルに高倍率で示されている。ヒト筋細胞（α－筋節アクチン、赤色）がＡｌｕ（緑色）で標識されている。心エコー図は、壁の梗塞領域における収縮の存在を示す（矢頭）。パネルＣは処置ラットにおける別の貫壁性梗塞（矢頭）を高倍率で示しており、梗塞の中間部における再生ヒト筋細胞（α－筋節アクチン、赤色）がＡｌｕ（緑色）で標識されている。心エコー図は、壁の梗塞領域における収縮の存在を示す（矢頭）。７４Ｄは、梗塞ラット心臓における心筋再生が駆出率を増加したことを示すグラフである。マウスにおける心エコー検査を、既に報告されているように処置マウスにおける収縮検出のためのみに使用した[13]。７４ＥおよびＦは、梗塞心臓の構造および機能に及ぼす心筋再生の影響を示すグラフである。結果は平均±ＳＤで示す。＊、†は、ｐ＜０．０５でＳＯおよびＭＩに対する差を示す。

【図７５】ｃ－ｋｉｔ[ＰＯＳ]細胞の多能性を示すグラフ。種々の継代（Ｐ）のｃ－ｋｉｔ[ＰＯＳ]細胞は心臓関与（ＧＡＴＡ４陽性）を得たり、筋細胞（α－筋節アクチン陽性）、ＳＭＣ（α－ＳＭアクチン陽性）、およびＥＣ（フォン・ヴィレブランド因子陽性）を生成する能力を持つ。結果は平均±ＳＤで示す。

【図７６】再生ヒト心筋の特性を示す顕微鏡写真。梗塞およびヒト細胞移植後の再生筋細胞および冠状細動脈。新たに形成された筋細胞（Ａ；心筋ミオシン重鎖、赤色）、ＳＭＣ（Ｂ，Ｄ，Ｅ；α－ＳＭアクチン、マゼンタ）、およびＥＣ（Ｃ、Ｆ、Ｇ；フォン・ヴィレブランド因子、黄色）が存在する。筋細胞間のラミニンの分布が白色蛍光で示されている（Ａ）。パネルＤとＥ、パネルＦとＧは同じ領域を示す。ＳＭＣ（ＤおよびＥ；矢印）およびＥＣ（ＦおよびＧ；矢印）が散在する。ＳＭＣおよびＥＣにおいてそれぞれＧＡＴＡ６（Ｄ；核内の赤色ドット）およびＥｔｓ１（Ｆ；核内のマゼンタドット）が検出された。これらの構造体はＡｌｕプローブ（緑色）に対して陽性を示す。Ａ～Ｇ：細胞移植の２１日後の梗塞免疫不全マウス。

【図７７】ヒト筋細胞の容積を示すグラフ。梗塞マウスおよびラットにおいて新たに形成されたヒト筋細胞のサイズ分布。

【図７８】機能的にコンピテントなヒト心筋を示す顕微鏡写真。処置マウスにおける貫壁性梗塞（矢頭）であり、梗塞の中間部の再生ヒト筋細胞はα－筋節アクチン（赤色）に対して陽性を示す。ヒト核はＡｌｕプローブ（緑色）で標識されている。心エコー図は、壁の梗塞領域における収縮の存在を示す（矢頭）。

【図７９】活性化ＣＳＣのホーミングおよび生着　ａ．梗塞の２４時間後におけるＥＧＦＰ（緑色）を発現するＧＦ活性化クローン原性ＣＳＣの注射部位。ｂ－ｄ．１２時間後、一部の活性化ＣＳＣはＴｄＴ標識されており（ｂ．マゼンタ、矢頭）、２４時間後、幾つかは細胞周期タンパク質Ｋｉ６７に対して陽性を示す（ｃ．白色、矢印）。ｄ．注射の１

２、２４、および４８時間後の、活性化ＣＳＣにおけるアポトーシス率および増殖率。値は平均±ｓ．ｄ．である。＊Ｐ＜０．０５で１２時間に対する。＊＊Ｐ＜０．０５で２４時間に対する。ｅ．梗塞および細胞注射の４８時間後、ＥＧＦＰ陽性心前駆細胞間（矢頭）、ＥＧＦＰ陽性心前駆細胞とＥＧＦＰ陰性レシピエント細胞の間（矢印）に、コネキシン４３、Ｎ－カドヘリン、Ｅ－カドヘリン、およびＬ－セレクチン（白色）が発現される。筋細胞はα－筋節アクチン（赤色）で、線維芽細胞はプロコラーゲン（黄色）で染色されている。ｆ．アポトーシスＥＧＦＰ陽性細胞（ＴｄＴ、マゼンタ、矢印）はＬ－セレクチン（白色）を発現しない。ｇ，無傷非梗塞心臓における移植の一ヵ月後のＧＦ活性化クローン原性ＣＳＣ、ＥＧＦＰ陽性（緑色）、の注射部位。核、ＰＩ（青色）。

【図８０】血管再生。ａ．２週間後の梗塞処置心臓の心筋外膜は、残余心筋内（矢印）および梗塞域（ＢＺ、矢頭）に３つの新たに形成された動脈（上方パネル、ＥＧＦＰ，緑色）を示す。血管分枝も見える（白抜き矢印）。ＥＧＦＰおよびα－平滑筋アクチン（α－ＳＭＡ）の共存が下方パネルに示されている（オレンジ色）。血管の短径が示されている。直径１８０μｍの血管は弾性内層を持つ（差込み図；ＩＥＬ、マゼンタ）。既存の冠状分枝はＥＧＦＰ陰性（上方パネル）およびα－ＳＭＡ陽性（下方パネル、赤色、アスタリスク）である。注射部位（ＳＩ）にＥＧＦＰ陽性細胞クラスターが存在する。筋細胞はα－筋節アクチン（α－ＳＡ）で標識されている。ｂ．２週間後の心外層の残余心筋は幾つかの大きな再生動脈を含み（上方パネル、ＥＧＦＰ、緑色）、それがＥＧＦＰおよびα－ＳＭＡを発現する（下方パネル、ＥＧＦＰ－α－ＳＭＡ、オレンジ色）。ｃ．壁の中間部の梗塞心筋は中小の再生冠状動脈を示し（上方パネル、ＥＧＦＰ、緑色）、それがＥＧＦＰおよびα－ＳＭＡを発現する（下方パネル、ＥＧＦＰ－α－ＳＭＡ、オレンジ色）。ｄ．心臓における血管形成の規模。値は平均±ｓ．ｄ．である。ｅ．再生冠状細動脈中のＳＭＣおよびＥＣは多くても２つのＸ染色体しか示さない。ＥＧＦＰ－α－ＳＭＡ、オレンジ色。Ｘ染色体、白色ドット。

【図８１】新たに形成された冠状血管は機能的にコンピテントである。ａ－ｆ．２週間後（ａ－ｃ）および一ヵ月後（ｄ－ｆ）の処置ラットの心外層の生存心筋（ａ，ｆ）および梗塞心筋（ｂ－ｅ）にある大きな冠状動脈はローダミン標識デキストラン（赤色）を含み、ＥＧＦＰ陽性壁（緑色）を有する。残存心筋（ａ，ｆ）内の梗塞血管（ｂ－ｅ）およびほぼ周辺の血管にはコラーゲン（青色）が豊富である。血管径を示す。パネルｅの血管およびその分枝はＥＧＦＰ陽性細胞に囲まれ、梗塞心筋内に位置する。パネルｆは、新たに形成された血管（ＥＧＦＰ陽性壁、緑色）と常在血管（ＥＧＦＰ陰性壁）の機能的統合を表す。白円は接合部を規定する。ｇ．心室構造と梗塞サイズ、ｈ．心室機能。左心室拡張終期圧、ＬＶＥＤＰ；ＬＶ発生圧力、ＬＶＤＰ。値は平均±ｓ．ｄ．で示す。未処置心筋梗塞、ＭＩ。処置心筋梗塞、ＭＩ－Ｔ。

【図８２】実験プロトコル。左前下降冠状動脈（ＬＡＤ）の結紮により永久冠状動脈閉塞を誘導した。２形態の処置を採用した：１．総数８０，０００～１００，０００のクローン原性ＥＧＦＰ^{ＰＯＳ}ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}ＣＳＣ（非活性化ＣＳＣ）の注射; ２．ｉｎ ｖｉｖｏ移植の２時間前にＧＦでｉｎ ｖｉｔｒｏ前処理したＥＧＦＰ^{ＰＯＳ}ｃ－ｋｉｔ^{ＰＯＳ}ＣＳＣの注射。注射は、境界域（ＢＺ）から離れた、結紮の上方、側方、下方、の複数部位（黒色ドット）に実施した。ＭＩ，心筋梗塞。

【図８３】心臓幹細胞死。ａ．注射の２４時間後、多数のクローン原性ＥＧＦＰ陽性（緑色）ＣＳＣがＴｄＴによって標識される（マゼンタ、矢頭）。生存筋細胞はα－筋節アクチン（白色）によって染色されている。核はヨウ化プロピジウム（ＰＩ、青色）によって標識されている。ｂ．注射の１２、２４、４８時間後のＣＳＣにおけるアポトーシスおよび増殖率。値は平均±ｓ．ｄ．で示す。

【図８４】血管再生。ａ．一ヵ月後の心外層の残余心筋は幾つかの大きな再生冠状動脈を含み（上方パネル、ＥＧＦＰ，緑色）、それがＥＧＦＰおよびα－ＳＭＡ（下方パネル、ＥＧＦＰ－α－ＳＭＡ、オレンジ色）を発現する。ｂ．壁の中間部の梗塞心筋は大中小の再生冠状動脈を示し（上方パネル、ＥＧＦＰ，緑色）、それらがＥＧＦＰおよびα－ＳＭＡ（下方パネル、ＥＧＦＰ－α－ＳＭＡ、オレンジ色）を発現する。ｃ．梗塞心筋中の再

生毛細血管はＥＧＦＰ（緑色）を発現し、ＥＣ特異的レクチン（白色）によって標識されている。

【図２】

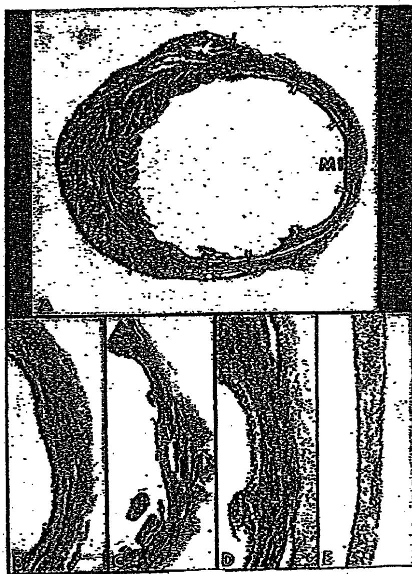


Figure 2

【図３】

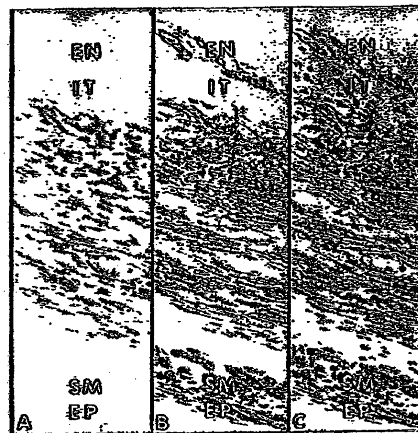


Figure 3

【図５】

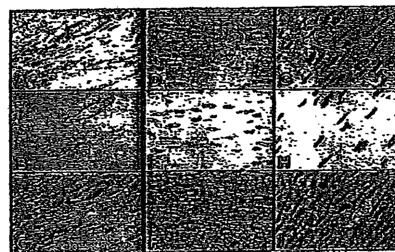


Figure 5

【図６】

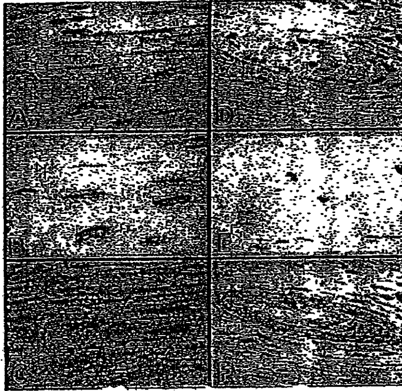


Figure 6

【図７】

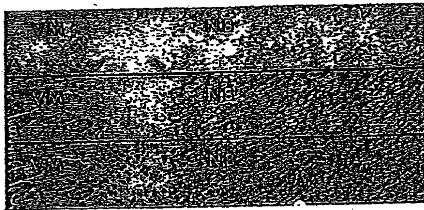


Figure 7

【図８】

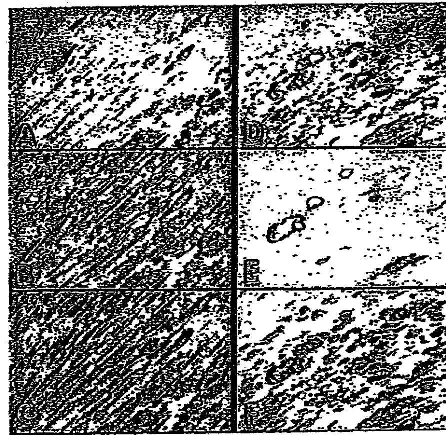


Figure 8

【図９】



Figure 9

【図１０】



Figure 10

【図１１】



Figure 11

【図１２】



Figure 12

【図１３－１】



Figure 13

【図１５－３】

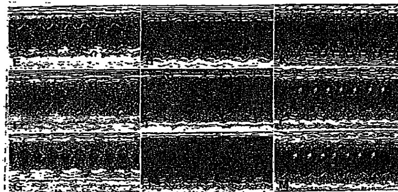


Figure 15

【図１６－３】

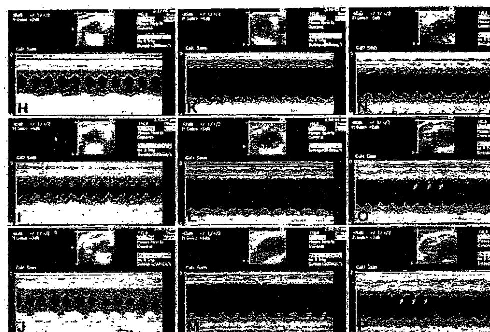


FIGURE 16

【図１８－３】



Figure 18

【図１９】

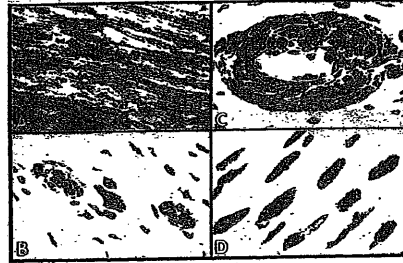


Figure 19

【図２０】

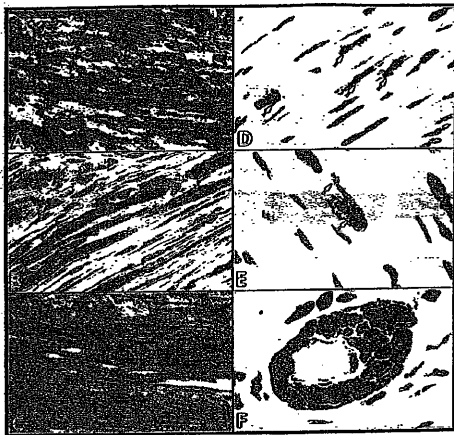


Figure 20

【図２１】



Figure 21

【図２２Ａ－Ｆ】

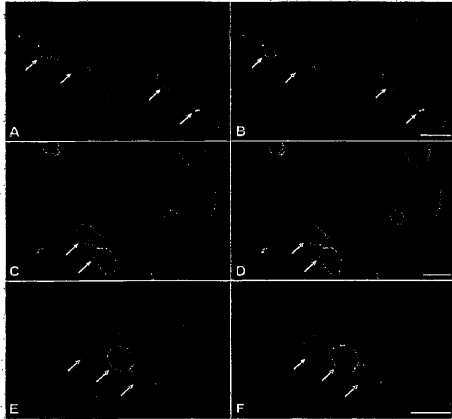


FIGURE 22A-F

【図２２Ｇ－Ｈ】

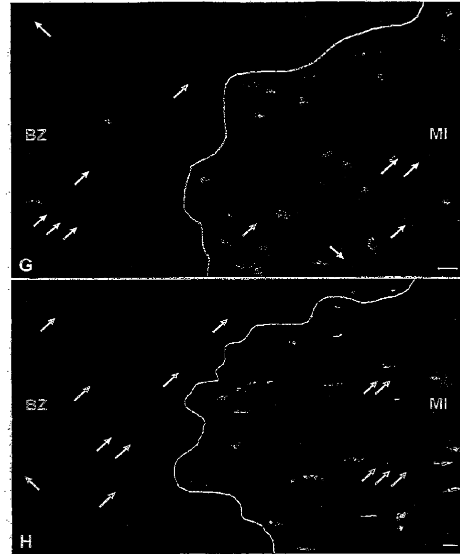


FIGURE 22G-H

【図２２Ｉ－Ｊ】

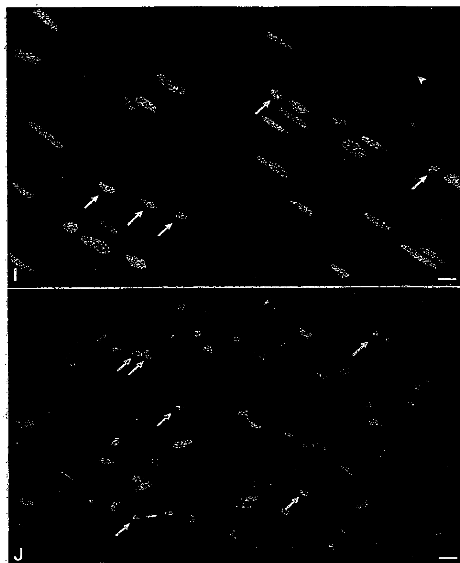


FIGURE 22I-J

【図２２Ｋ－Ｌ】

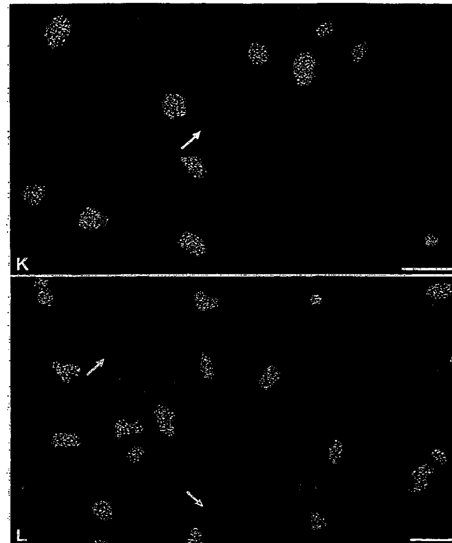


FIGURE 22K-L

【図２３Ｃ－Ｄ】

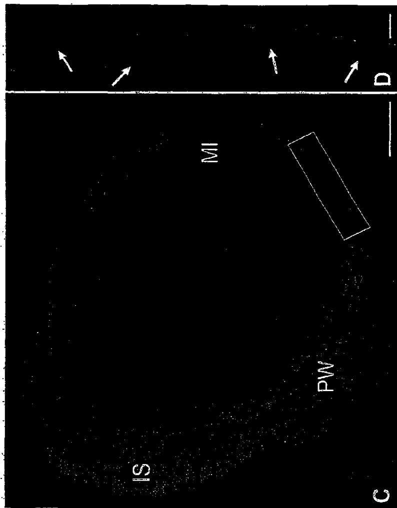


FIGURE 23C-D

【図２３Ｅ－Ｆ】

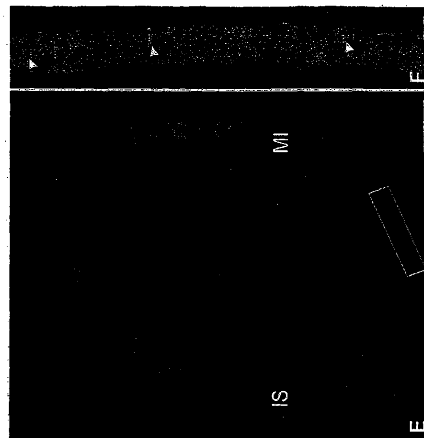


FIGURE 23E-F

【図２３Ｇ－Ｈ】

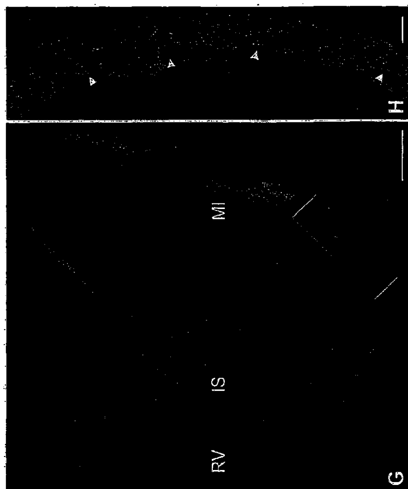


FIGURE 23G-H

【図２４Ａ－Ｄ】

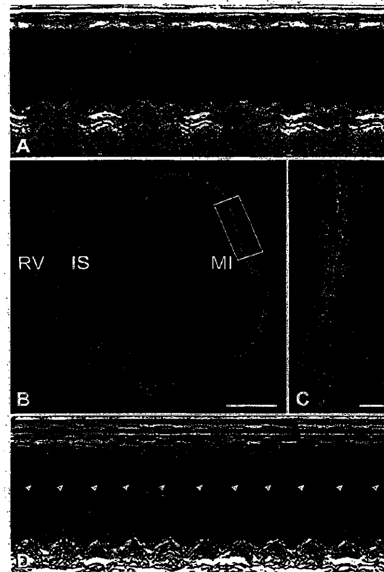


FIGURE 24A-D

【図２５Ａ－Ｂ】

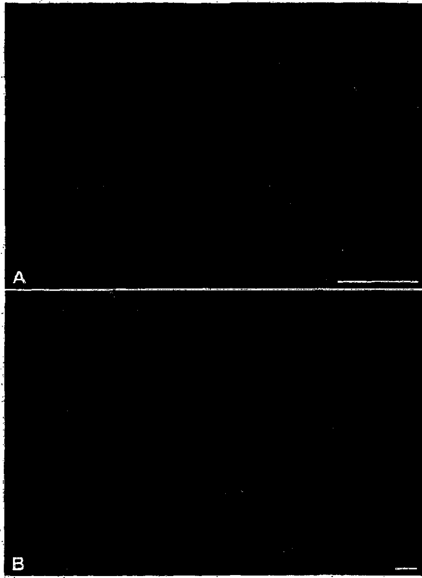


FIGURE 25A-B

【図２６Ａ－Ｆ】

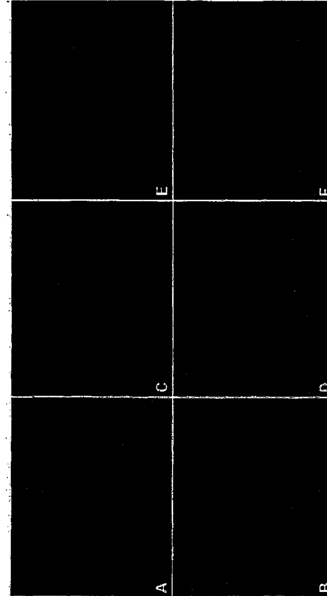


FIGURE 26A-F

【図２６Ｇ－Ｊ】

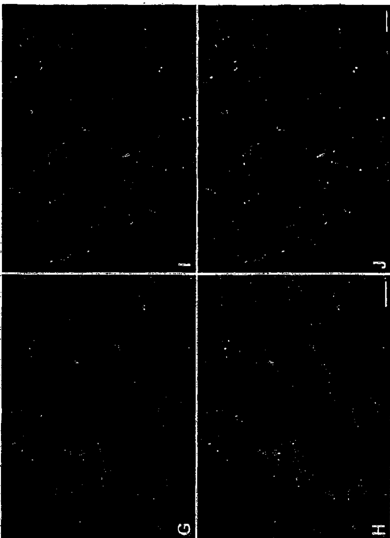
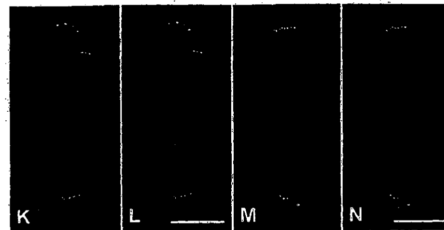


FIGURE 26G-J

【図２６Ｋ－Ｎ】



[GURE 26K-N

【図２７Ａ－Ｄ】

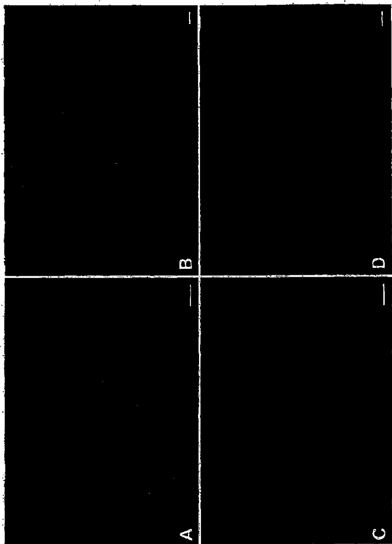


FIGURE 27A-D

【図２８Ａ－Ｂ】

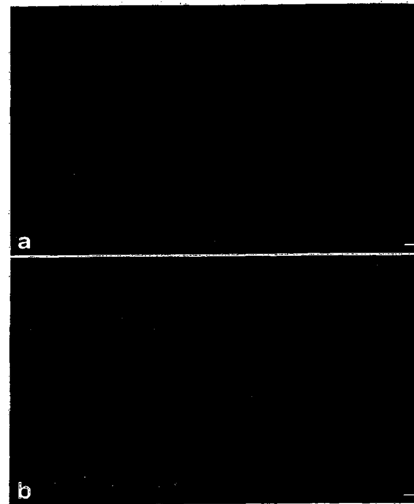


FIGURE 28A-B

【図２８Ｃ－Ｆ】

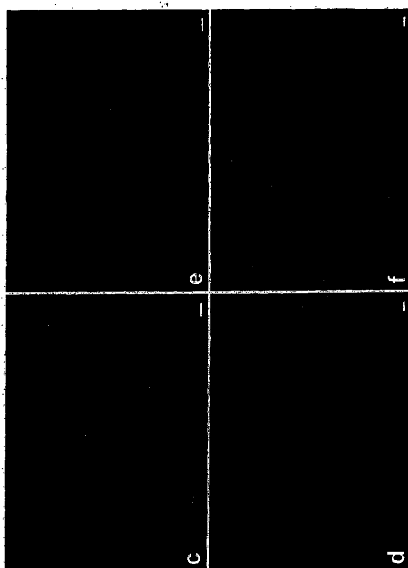


FIGURE 28C-F

【図２８Ｇ－Ｈ】

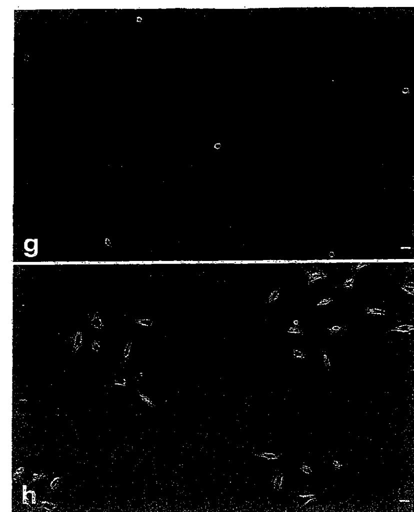


FIGURE 28G-H

【図２９Ａ－Ｄ】

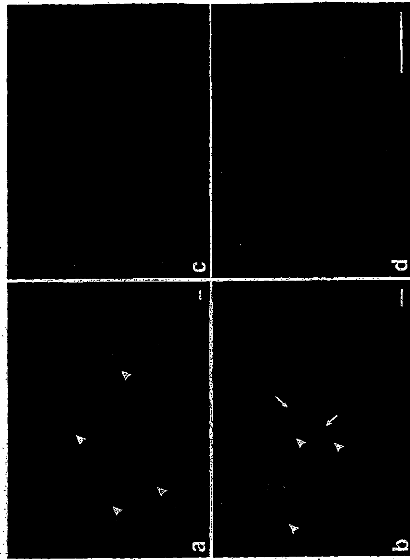


FIGURE 29A-D

【図２９Ｅ－Ｈ】



FIGURE 29E-H

【図３０Ａ－Ｄ】

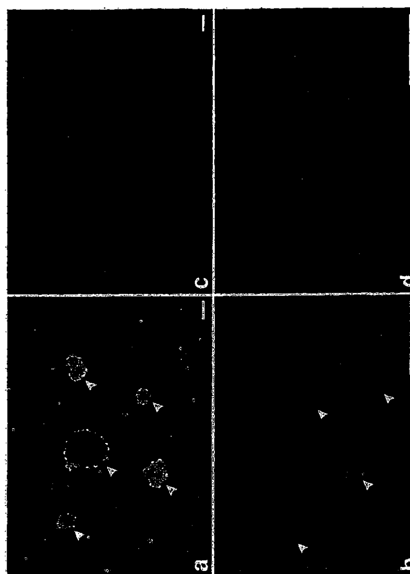


FIGURE 30A-D

【図３０Ｅ－Ｈ】

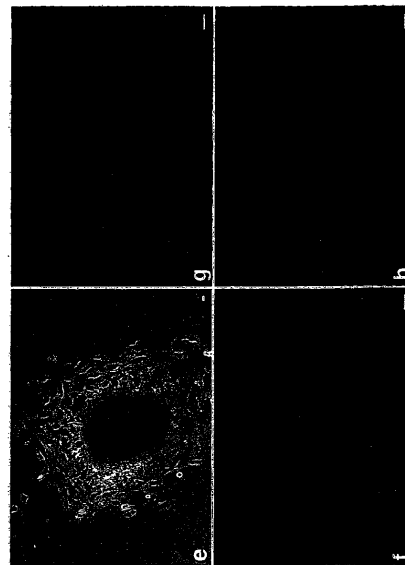


FIGURE 30E-H

【図３１Ａ－Ｃ】

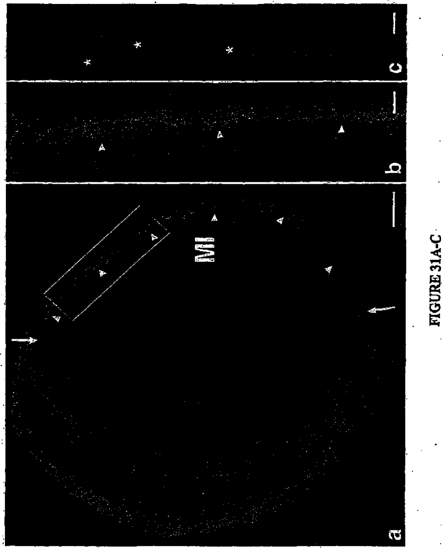


FIGURE 31A-C

【図３１Ｄ－Ｅ】



FIGURE 31D-E

【図３１Ｆ－Ｎ】

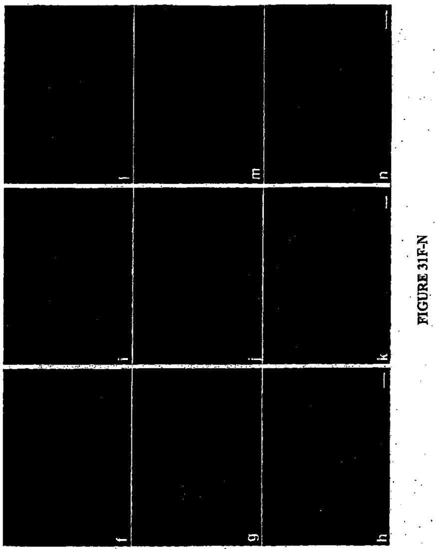


FIGURE 31F-N

【図３１Ｏ－Ｐ】

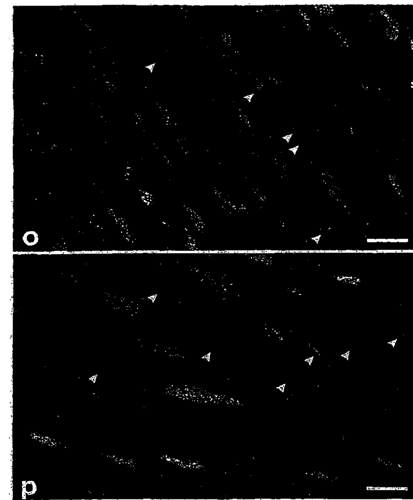


FIGURE 31O-P

【図３２Ａ－Ｅ】

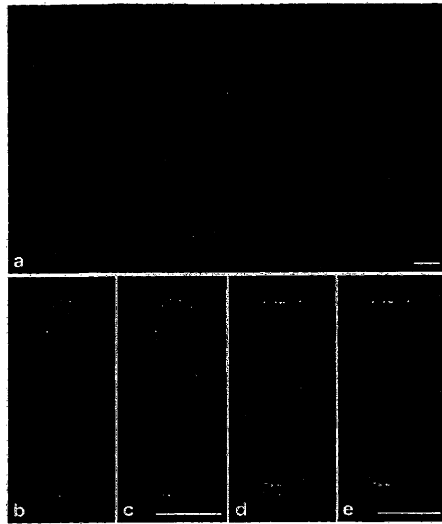


FIGURE 32A-E

【図３４Ａ－Ｃ】

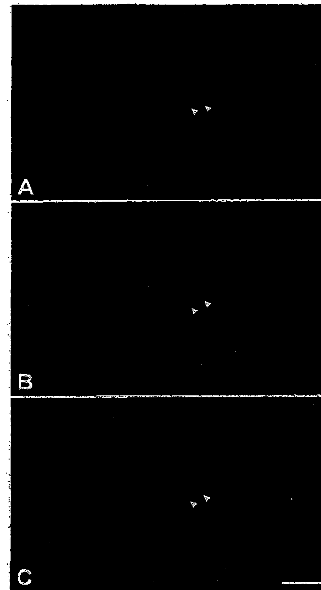


FIGURE 34A-C

【図３５】

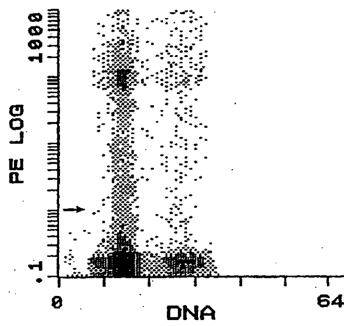


FIGURE 35

【図３７】

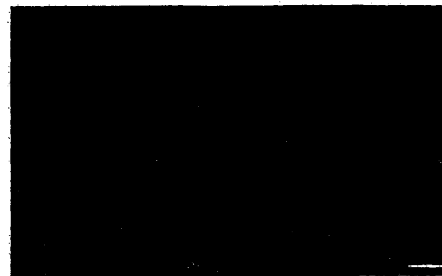


FIGURE 37

【図４０】



FIGURE 40

【図４１】

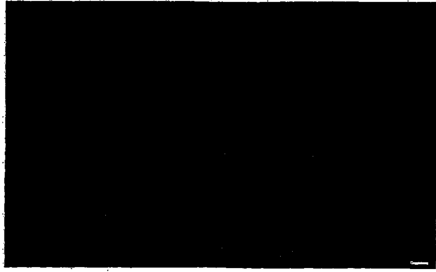


FIGURE 41

【図４３】

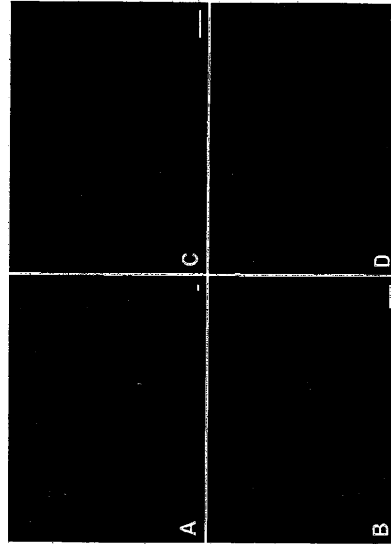


FIGURE 43

【図４４Ａ－Ｆ】

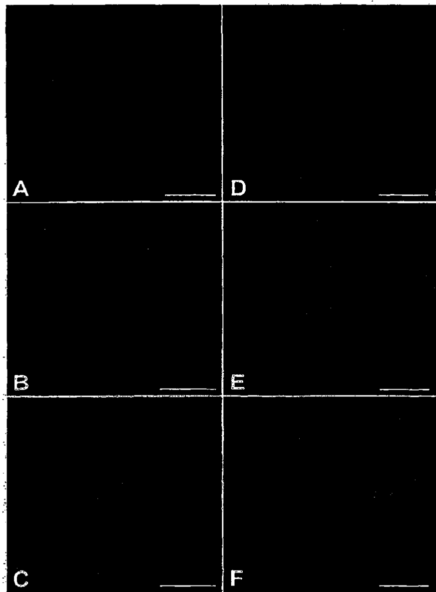


FIGURE 44A-F

【図４５Ａ－Ｆ】

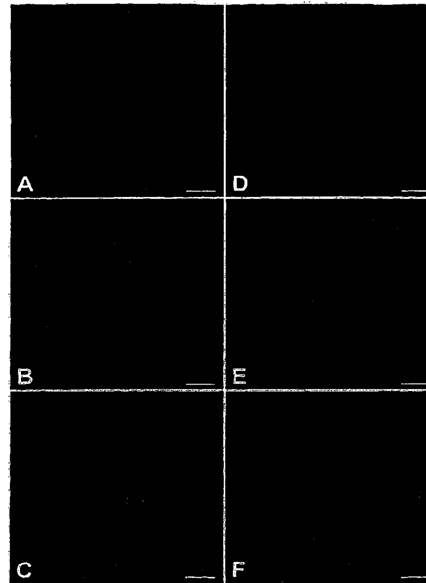


FIGURE 45A-F

【図４６Ａ－Ｄ】

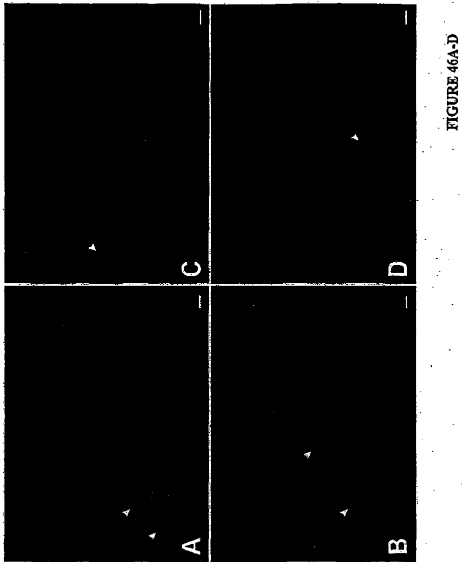


FIGURE 46A-D

【図４７Ａ－Ｈ】

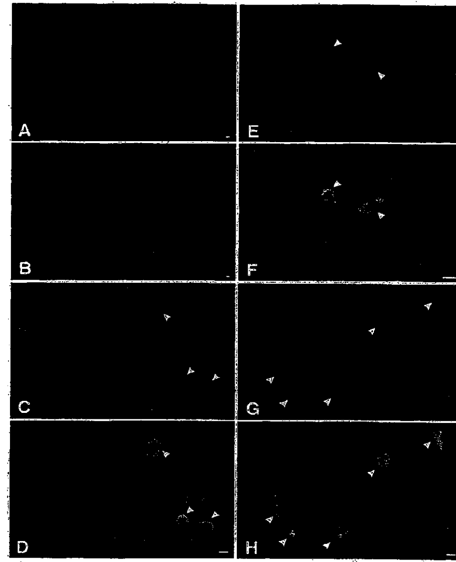


FIGURE 47A-H

【図４９Ａ－Ｂ】

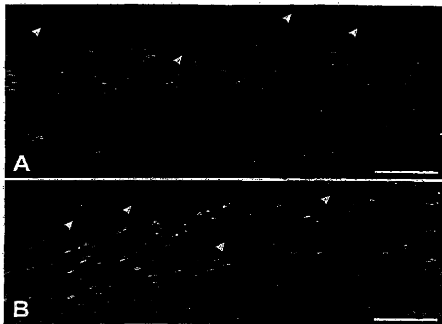


FIGURE 49A-B

【図５０Ａ－Ｃ】

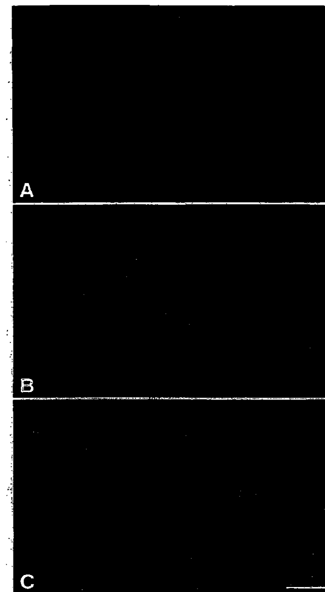


FIGURE 50A-C

【図５３Ａ－Ｆ】

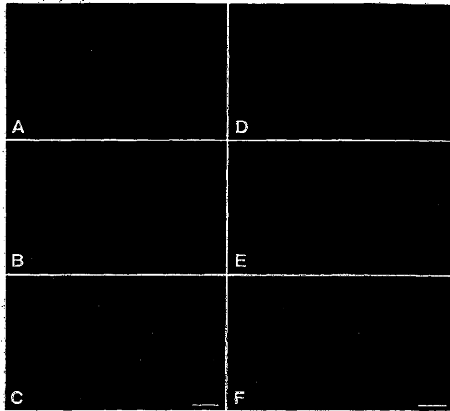


FIGURE 53A-F

【図５６】

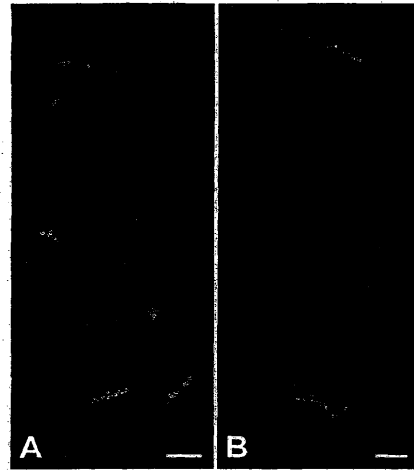


FIGURE 56

【図５８Ａ－Ｆ】

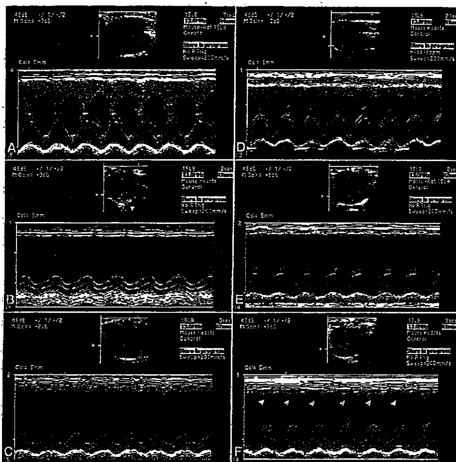


FIGURE 58A-F

【図６０Ａ－Ｄ】

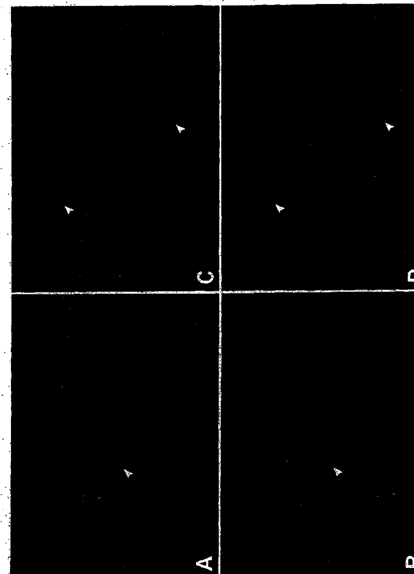


FIGURE 60A-D

【図７０Ａ－Ｃ】

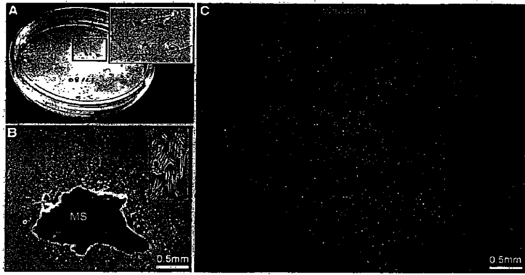


Figure 70A-C

【図７１Ａ－Ｃ】

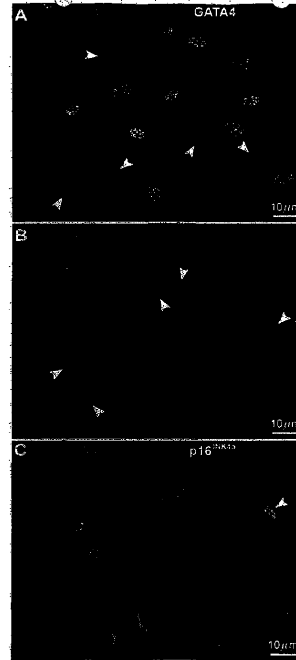


Figure 71A-C

【図７１Ｅ－Ｇ】

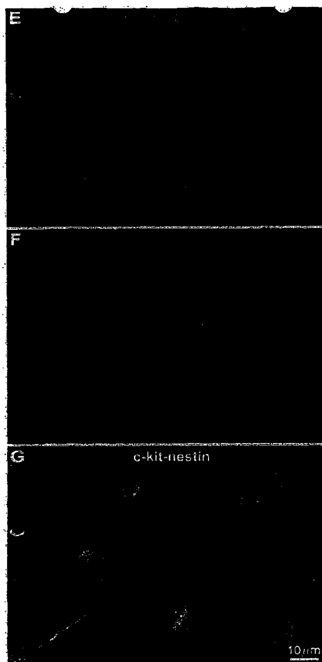


Figure 71E-G

【図７１Ｈ】

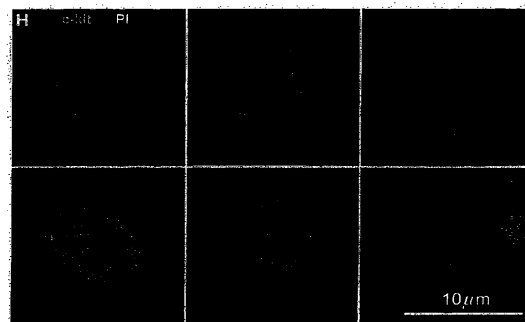


Figure 71H

【図７１Ｉ】

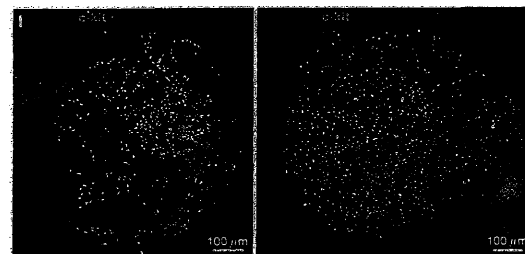


Figure 71I

【図７１Ｊ】

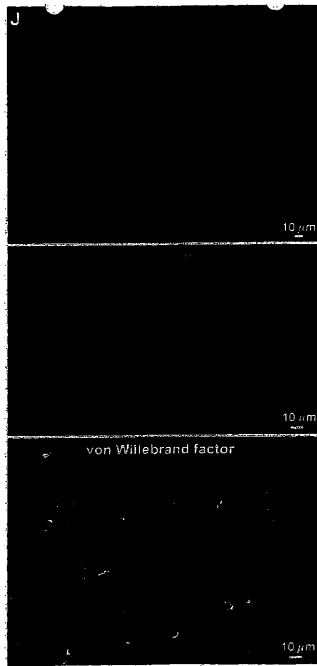


Figure 71J

【図７２Ａ】

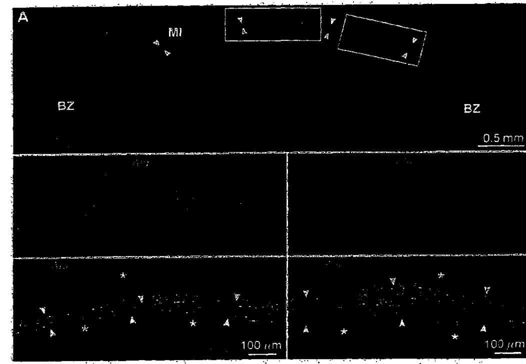


Figure 72A

【図７２Ｂ－Ｃ】

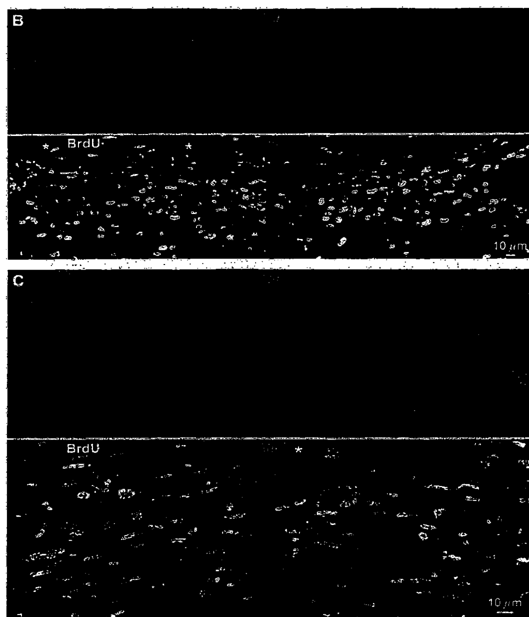


Figure 72B-C

【図７２Ｅ－Ｈ】



Figure 72E-H

【図７２Ｉ－Ｊ】

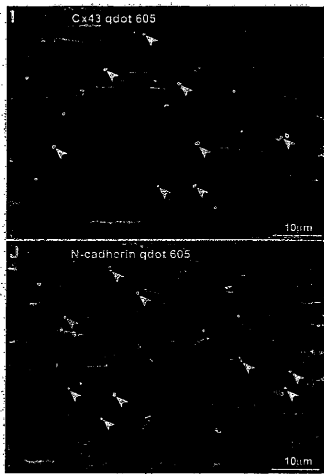


Figure 72I-J

【図７３Ａ－Ｆ】

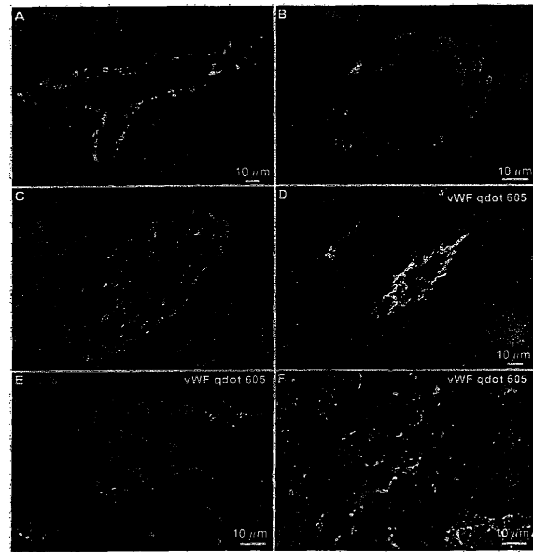


Figure 73A-F

【図７３Ｈ】

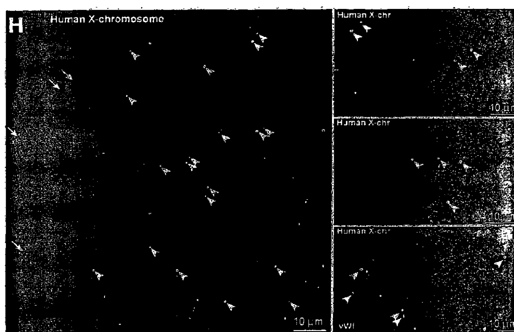


Figure 73 H

【図７４Ａ】

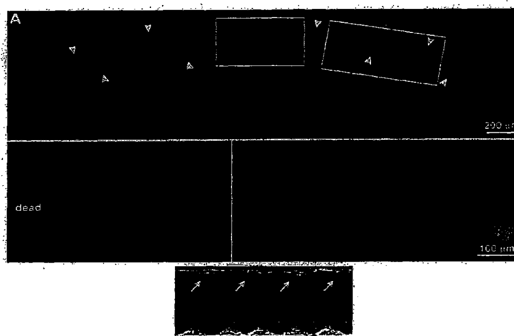


Figure 74A

【図７４Ｂ】

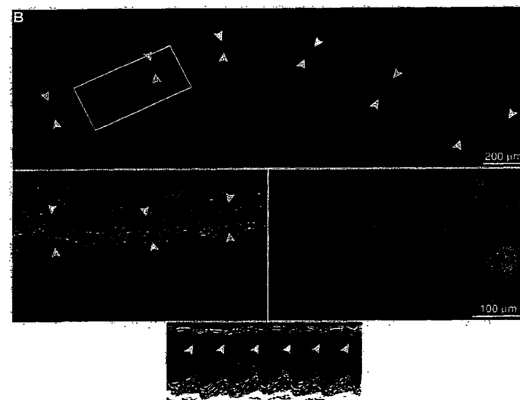


Figure 74 B

【図７４Ｃ】

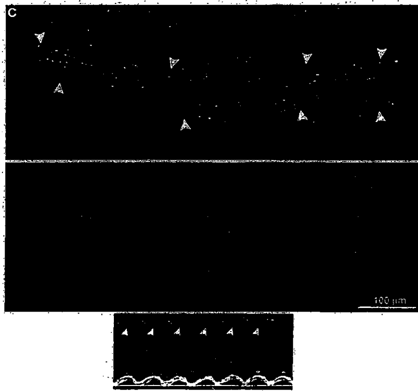


Figure 74C

【図７８】

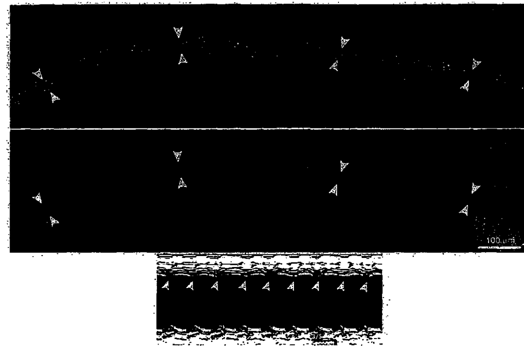


Figure 78

【図７９Ａ】

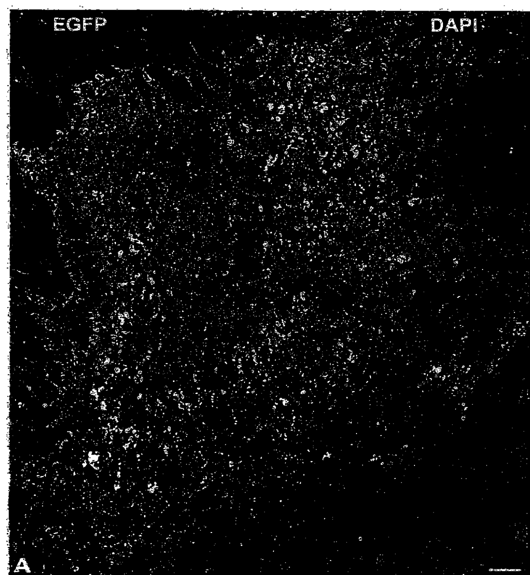


Figure 79A

【図７９Ｇ】



Figure 79G

【図８０Ａ】

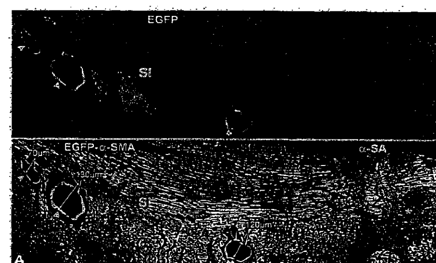


Figure 80A

【図８０Ｂ】

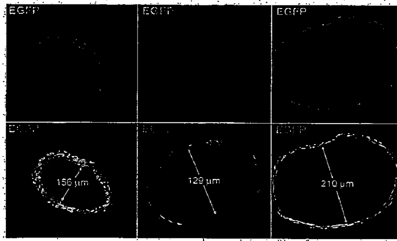


Figure 80B

【図８０Ｃ】

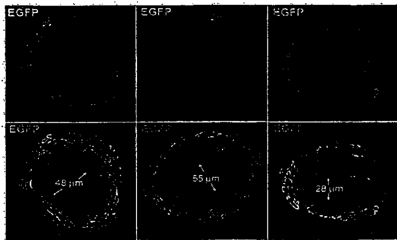


Figure 80C

【図８４Ａ】

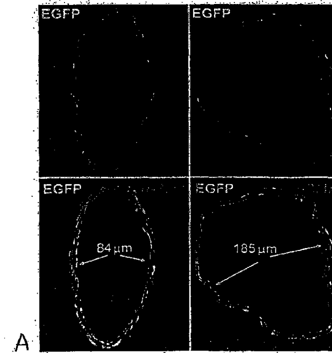
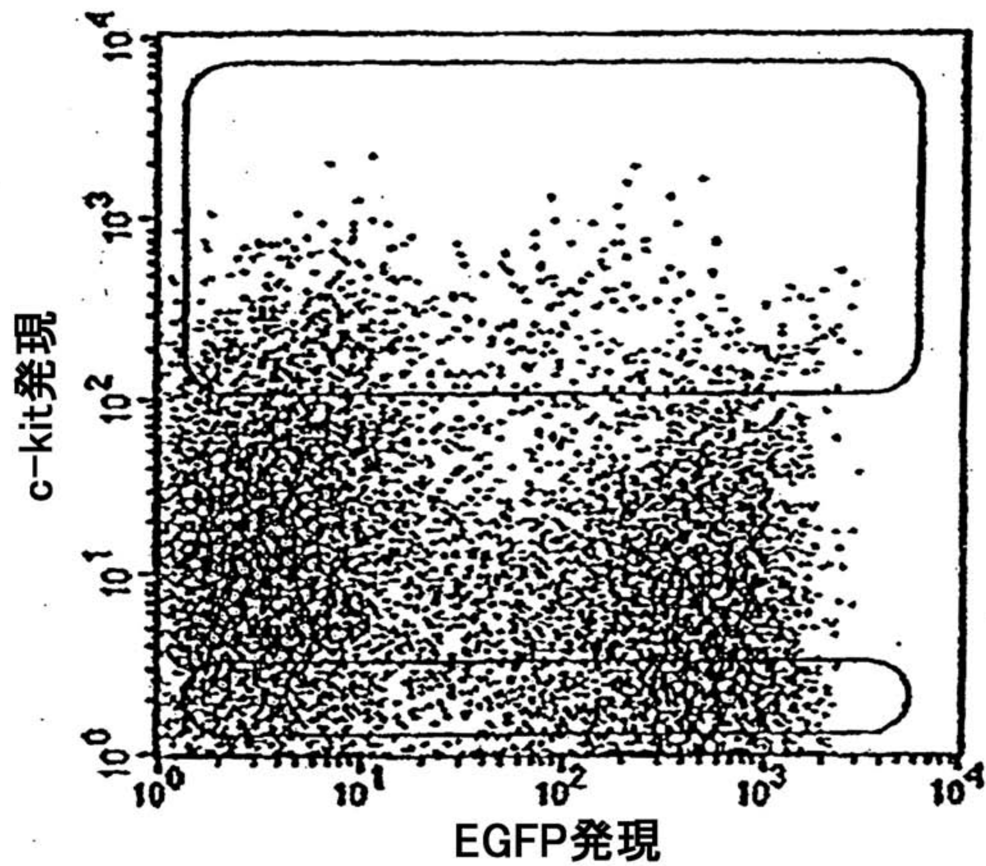
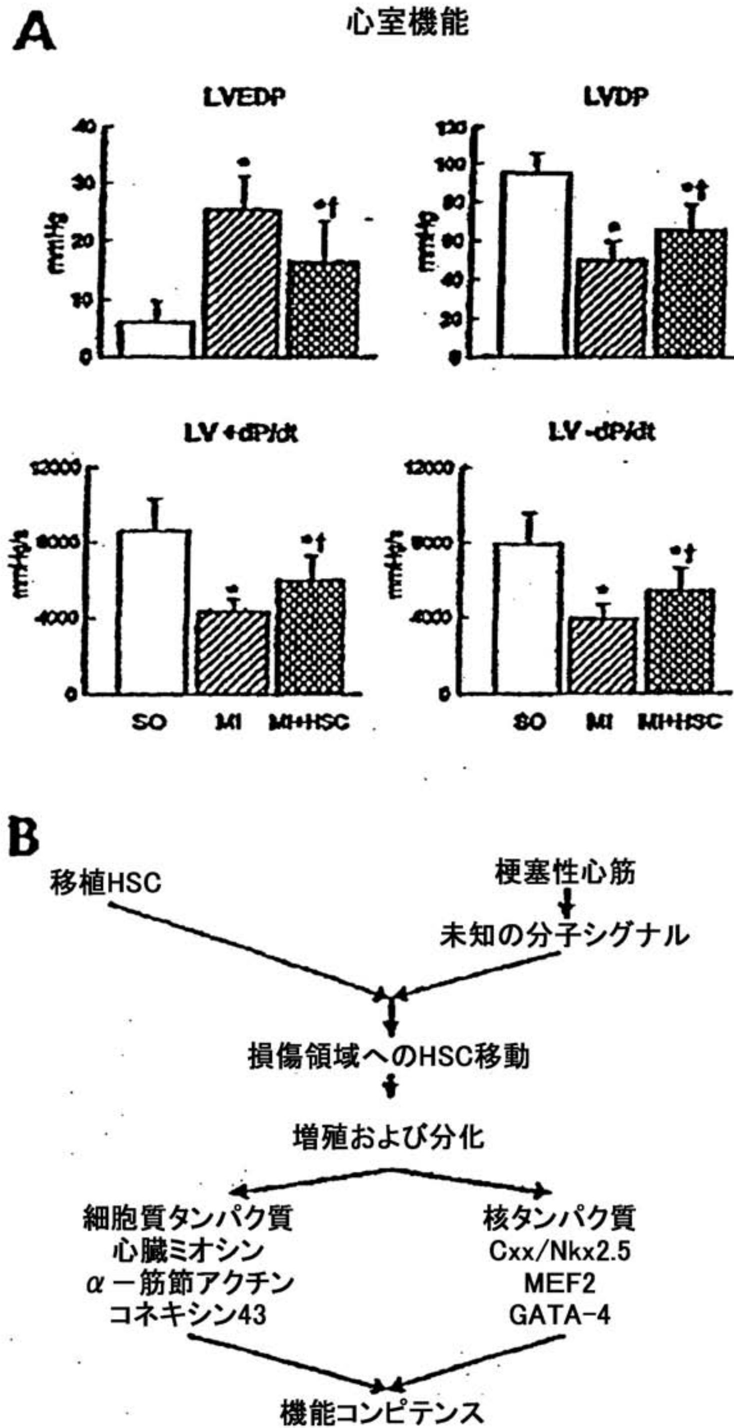


Figure 84 A

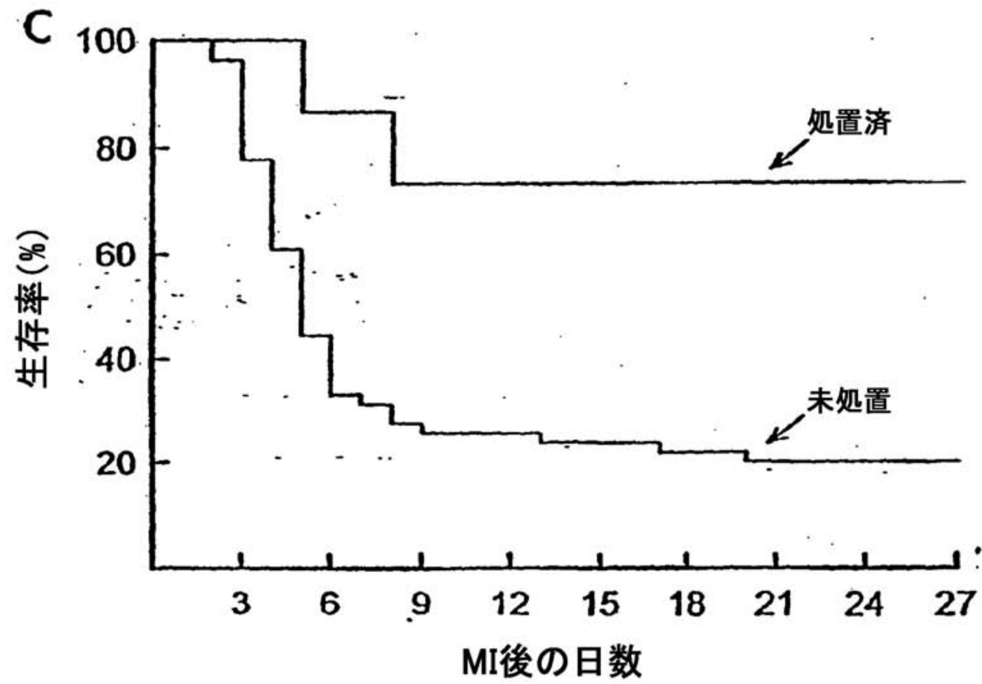
【図１】



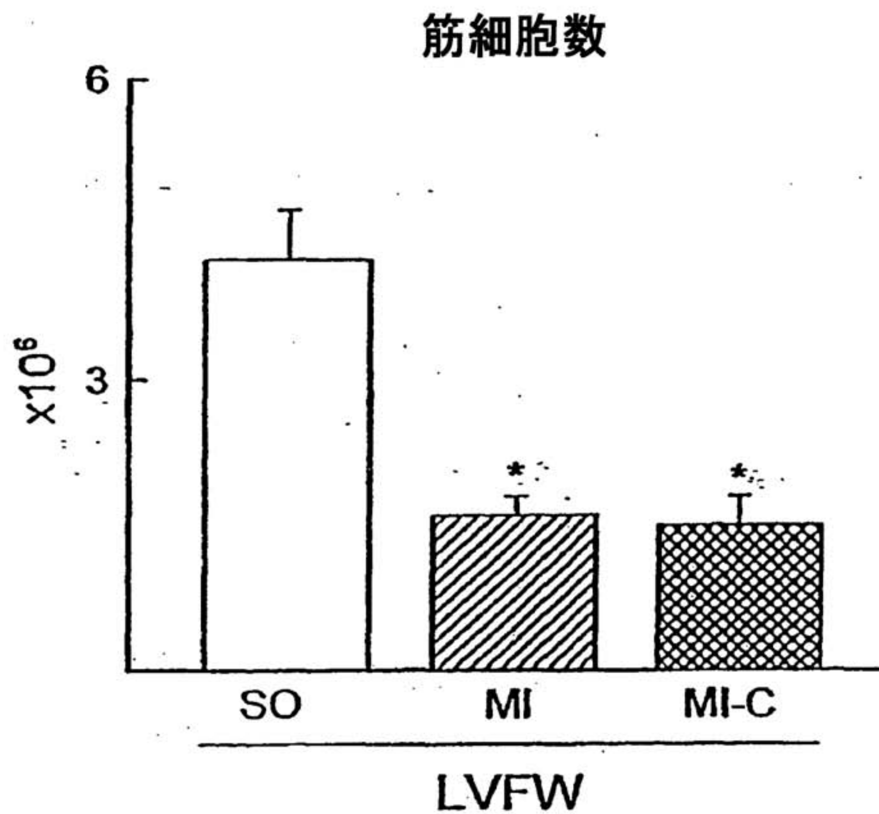
【図４】


A
心室機能
LVEDP
mmHg
LVDP
mmHg
LV +dP/dt
mmHg/s
LV -dP/dt
mmHg/s
SO
MI
MI+HSC
B
移植HSC
梗塞性心筋
未知の分子シグナル
損傷領域へのHSC移動
増殖および分化
細胞質タンパク質
心臓ミオシン
α－筋節アクチン
コネキシン43
核タンパク質
Cxx/Nkx2.5
MEF2
GATA-4
機能コンピテンス

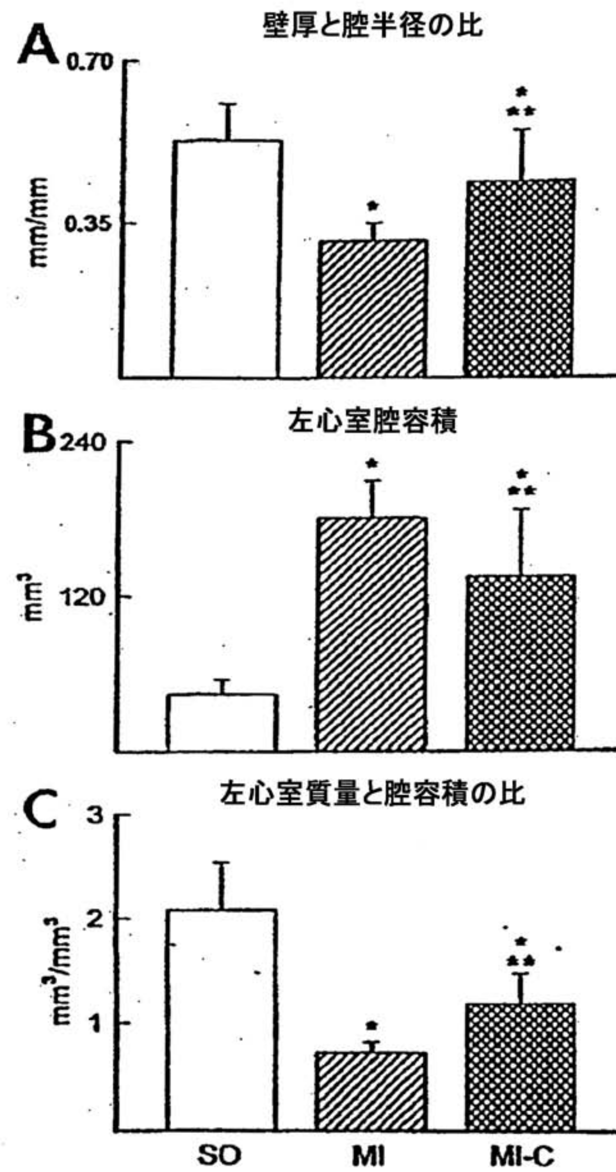
【図１３－２】


C
100
80
60
40
20
生存率(%)
処置済
未処置
3
6
9
12
15
18
21
24
27
MI後の日数

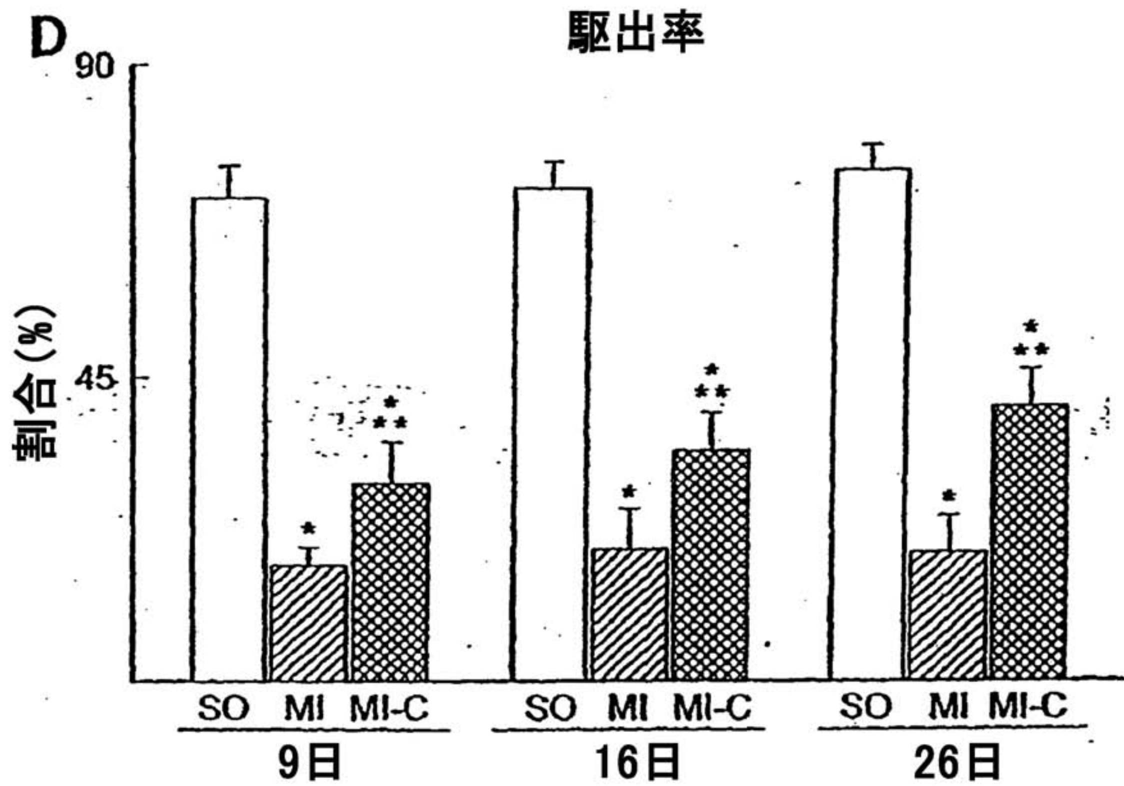
【図１４】


筋細胞数
6
3
X10^6
*
*
SO
MI
MI-C
LVFW

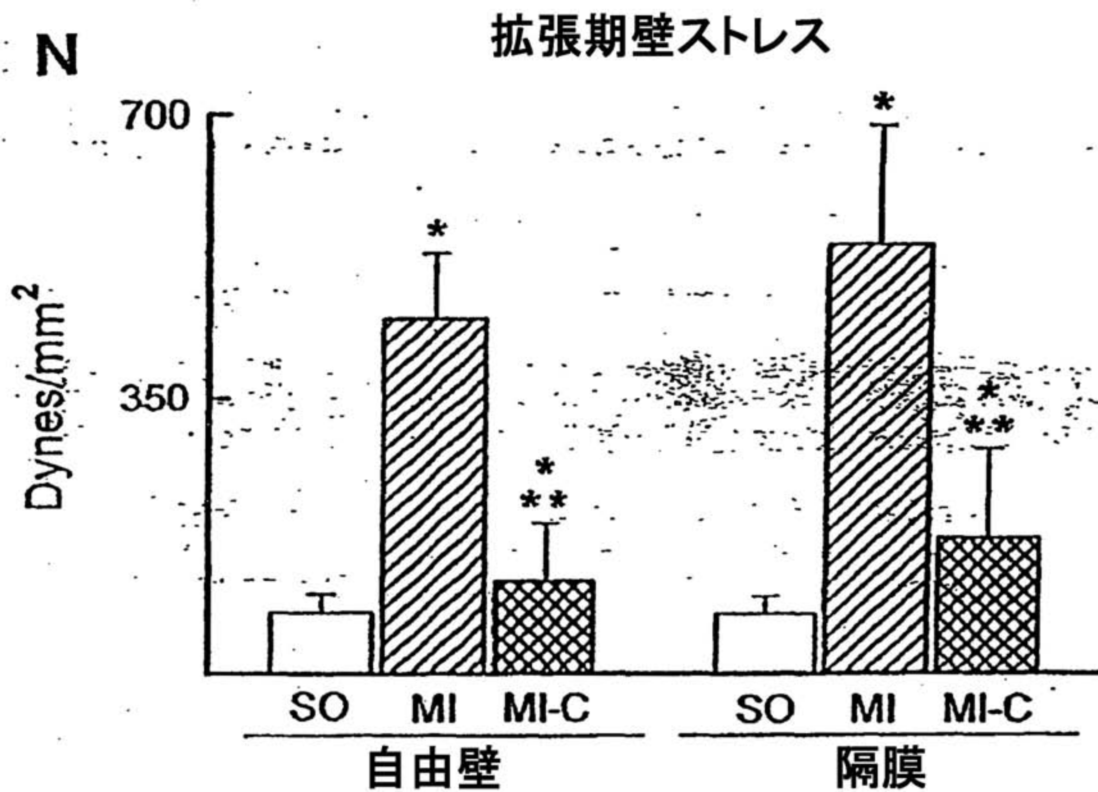
【図１５－１】


A
壁厚と腔半径の比
0.70
0.35
mm/mm
B
左心室腔容積
240
120
mm3
C
左心室質量と腔容積の比
3
2
1
mm3/mm3
SO
MI
MI-C

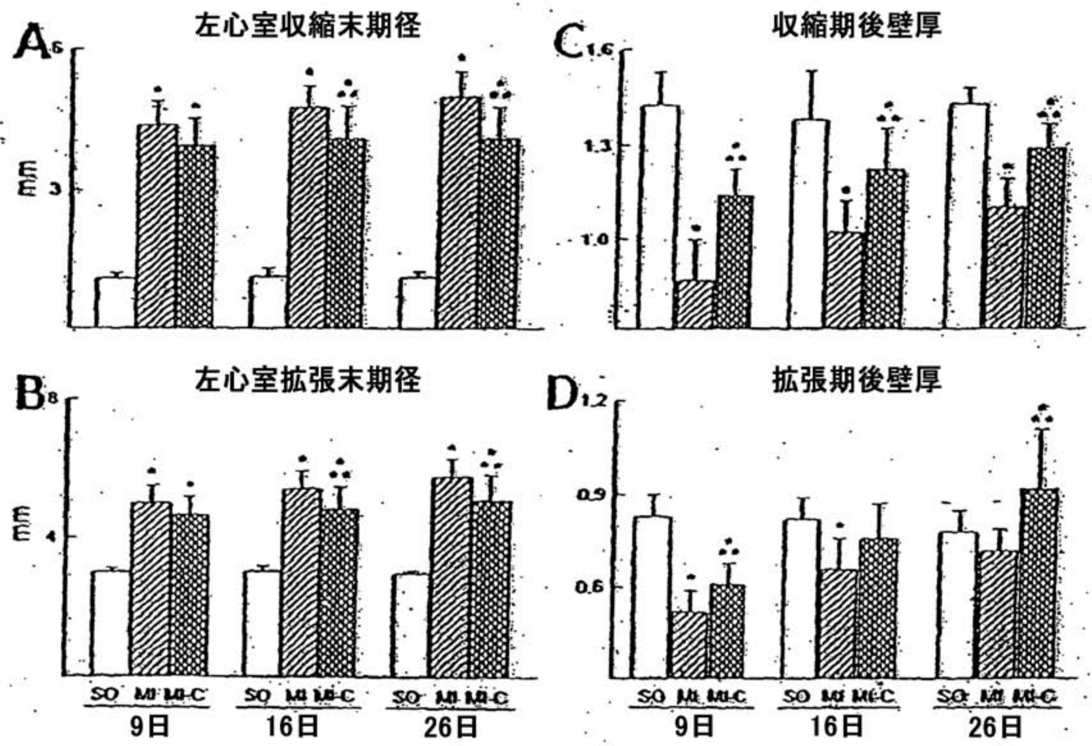
【図１５－２】


D
駆出率
90
45
割合(%)
SO MI MI-C
9日
SO MI MI-C
16日
SO MI MI-C
26日

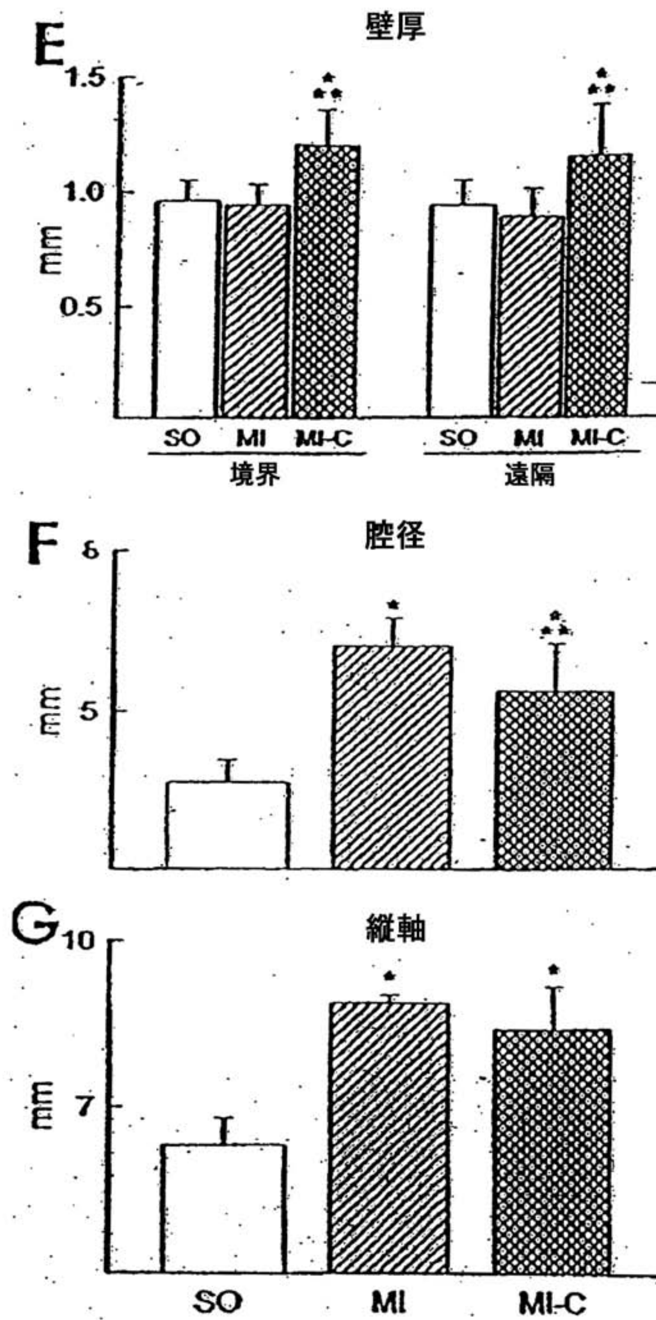
【図１５－４】


N
拡張期壁ストレス
700
350
Dynes/mm2
SO MI MI-C
自由壁
SO MI MI-C
隔膜

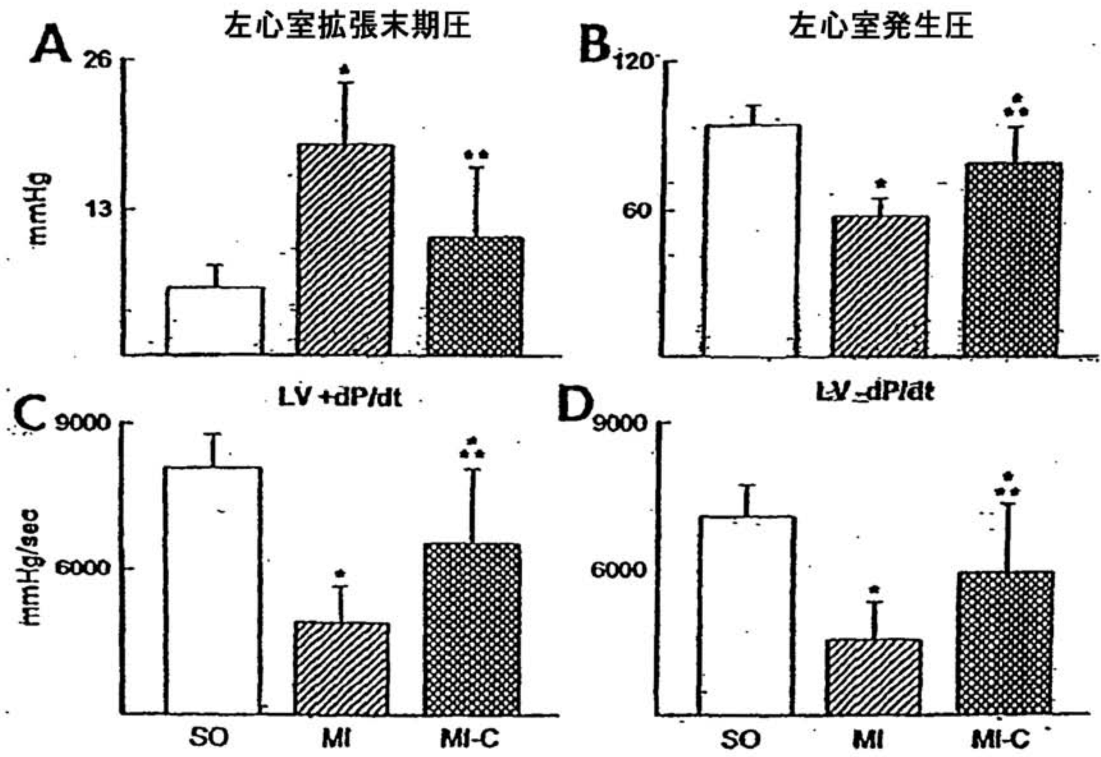
【図１６－１】


A
左心室収縮末期径
mm
6
3
C
収縮期後壁厚
1.6
1.3
1.0
B
左心室拡張末期径
mm
8
4
D
拡張期後壁厚
1.2
0.9
0.6
SO MI MI-C
9日
16日
26日

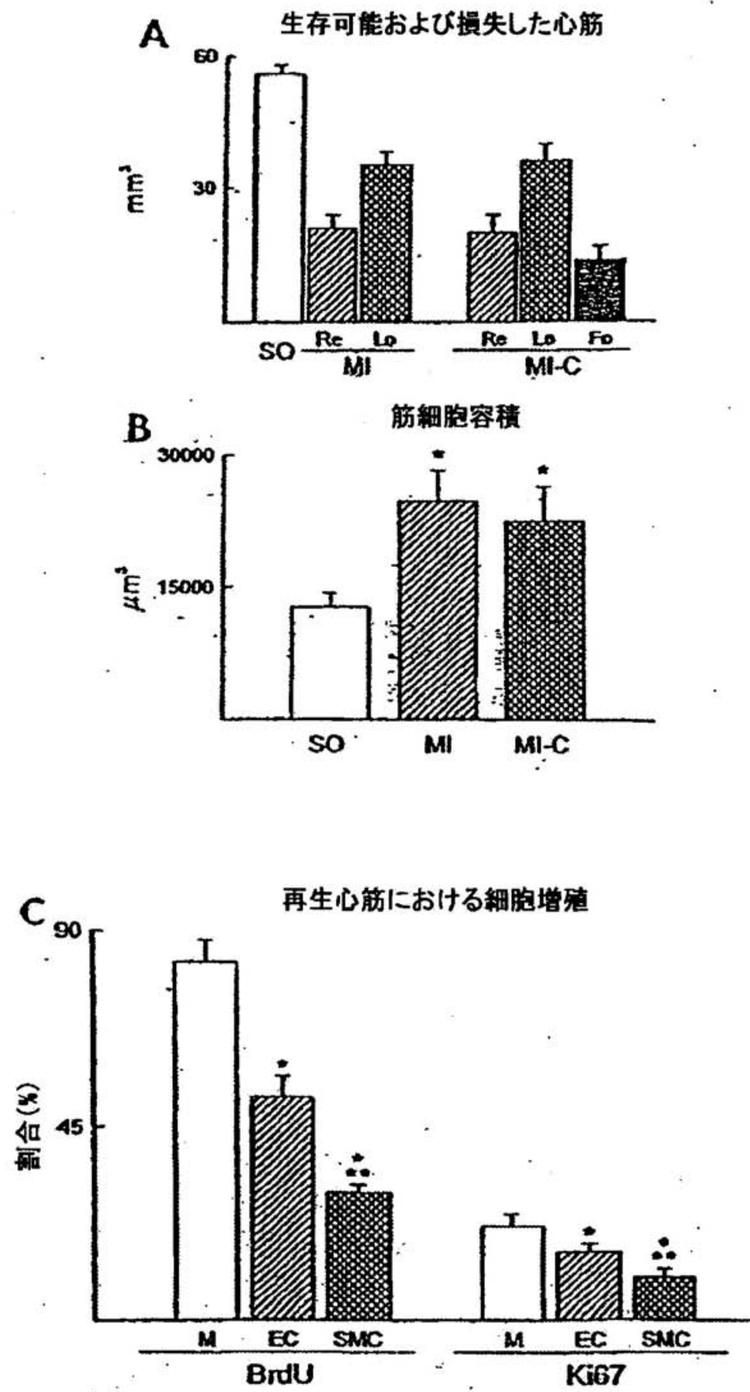
【図１６－２】


E
壁厚
1.5
1.0
0.5
mm
SO
MI
MI-C
SO
MI
MI-C
境界
遠隔
F
腔径
5
mm
G
縦軸
10
7
mm
SO
MI
MI-C

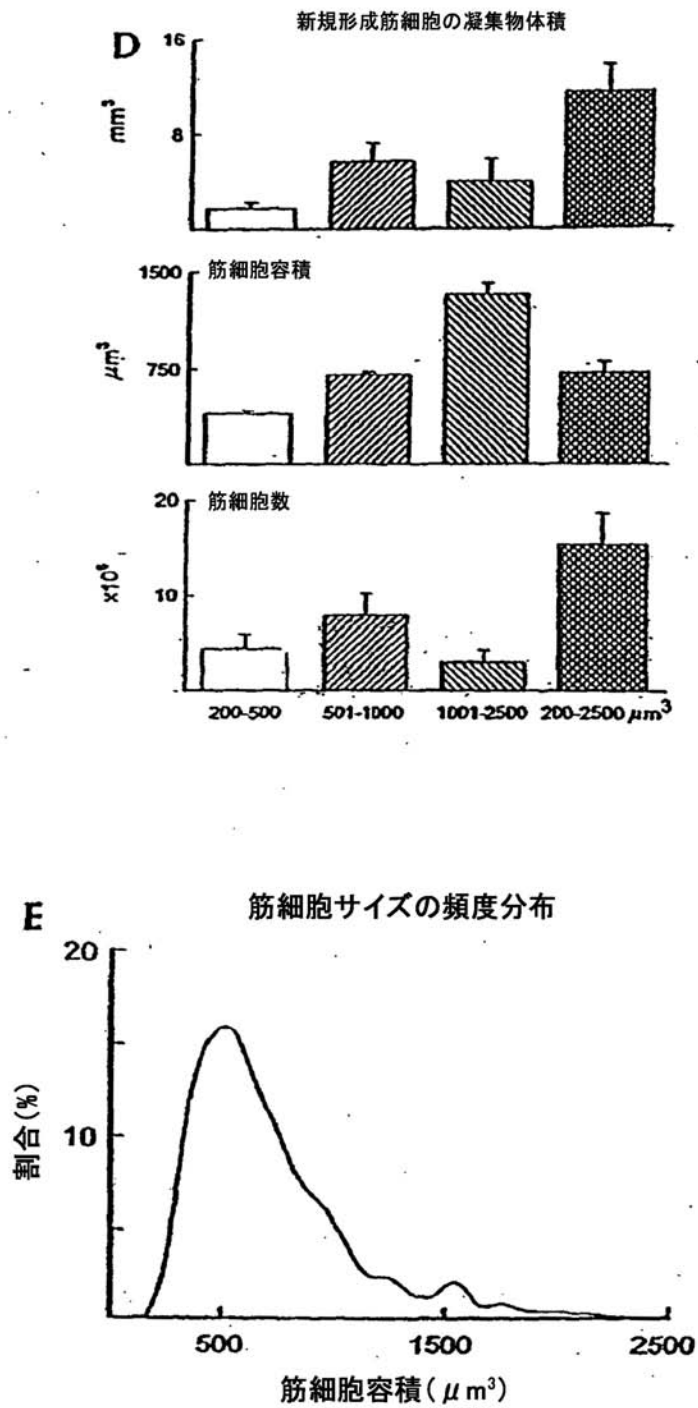
【図１７】


A
左心室拡張末期圧
26
13
mmHg
B
左心室発生圧
120
60
C
LV +dP/dt
9000
6000
mmHg/sec
D
LV -dP/dt
9000
6000
SO
MI
MI-C
SO
MI
MI-C

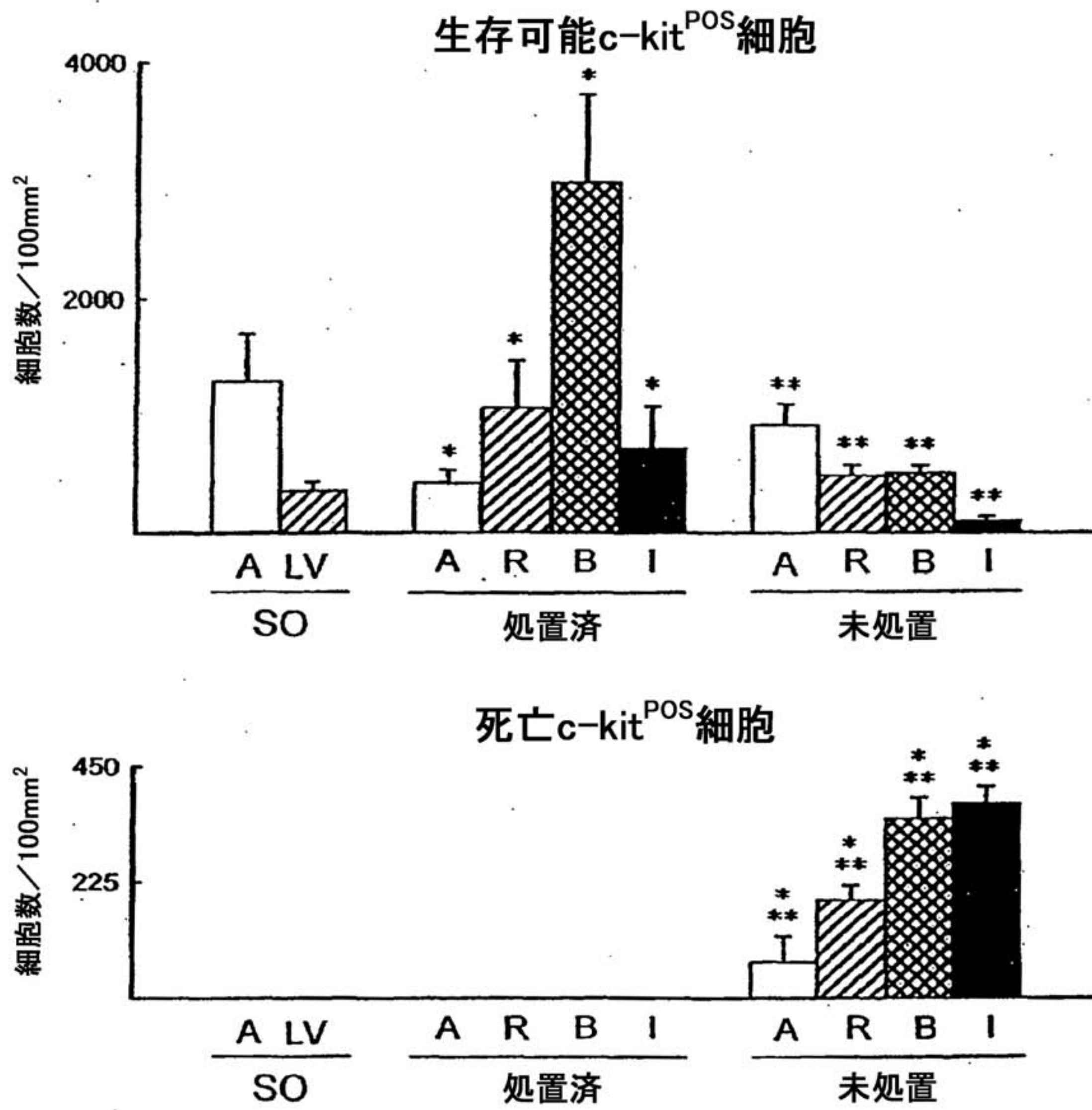
【図１８－１】


A
生存可能および損失した心筋
60
30
mm3
SO
Re
Lo
MI
Re
Lo
Fo
MI-C
B
筋細胞容積
30000
15000
μm3
SO
MI
MI-C
C
再生心筋における細胞増殖
90
45
割合(%)
M
EC
SMC
BrdU
M
EC
SMC
Ki67

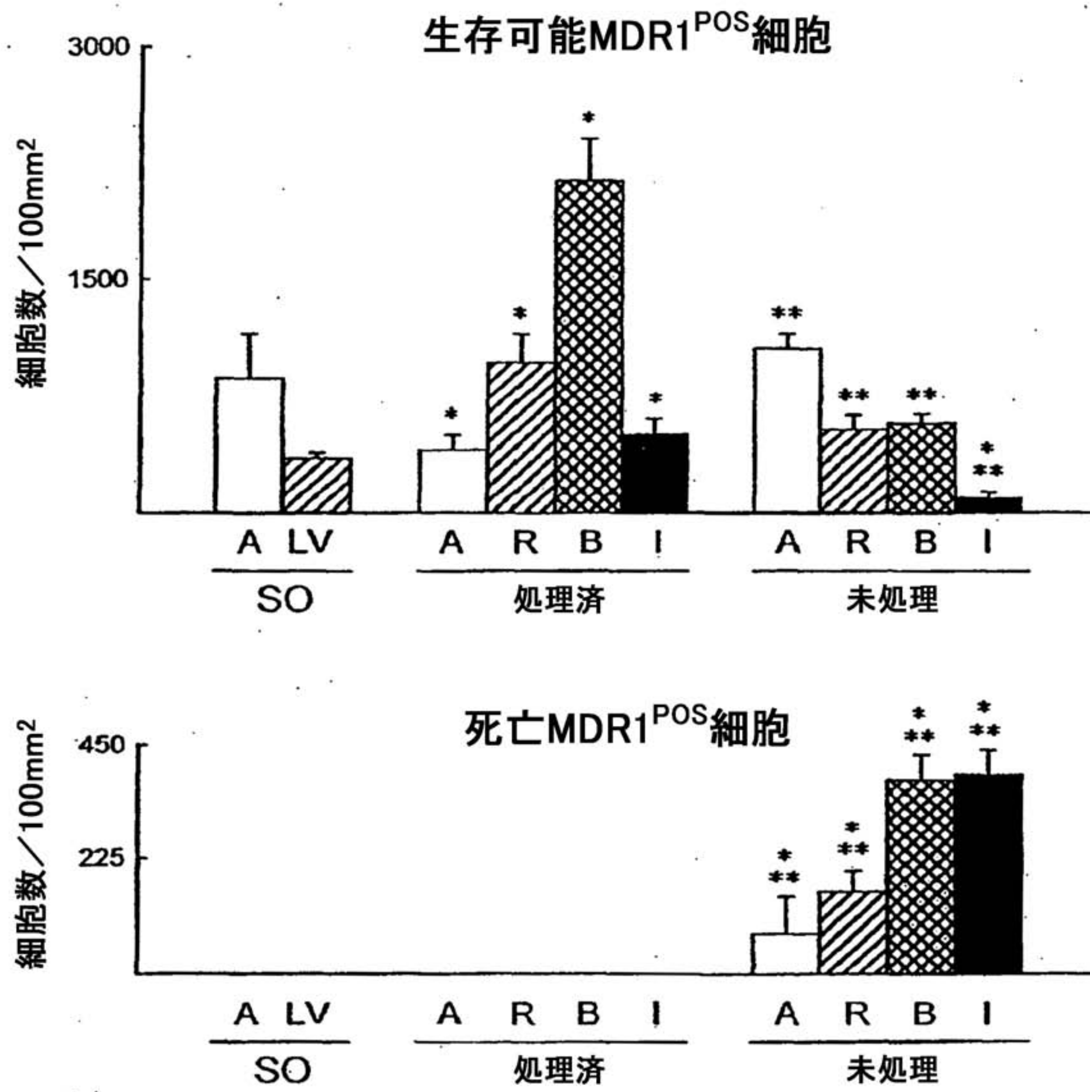
【図１８－２】


D
新規形成筋細胞の凝集物体積
16
mm³
8
筋細胞容積
1500
μm³
750
筋細胞数
20
x10⁶
10
200-500
501-1000
1001-2500
200-2500 μm³
E
筋細胞サイズの頻度分布
20
割合(%)
10
500
1500
2500
筋細胞容積(μm³)

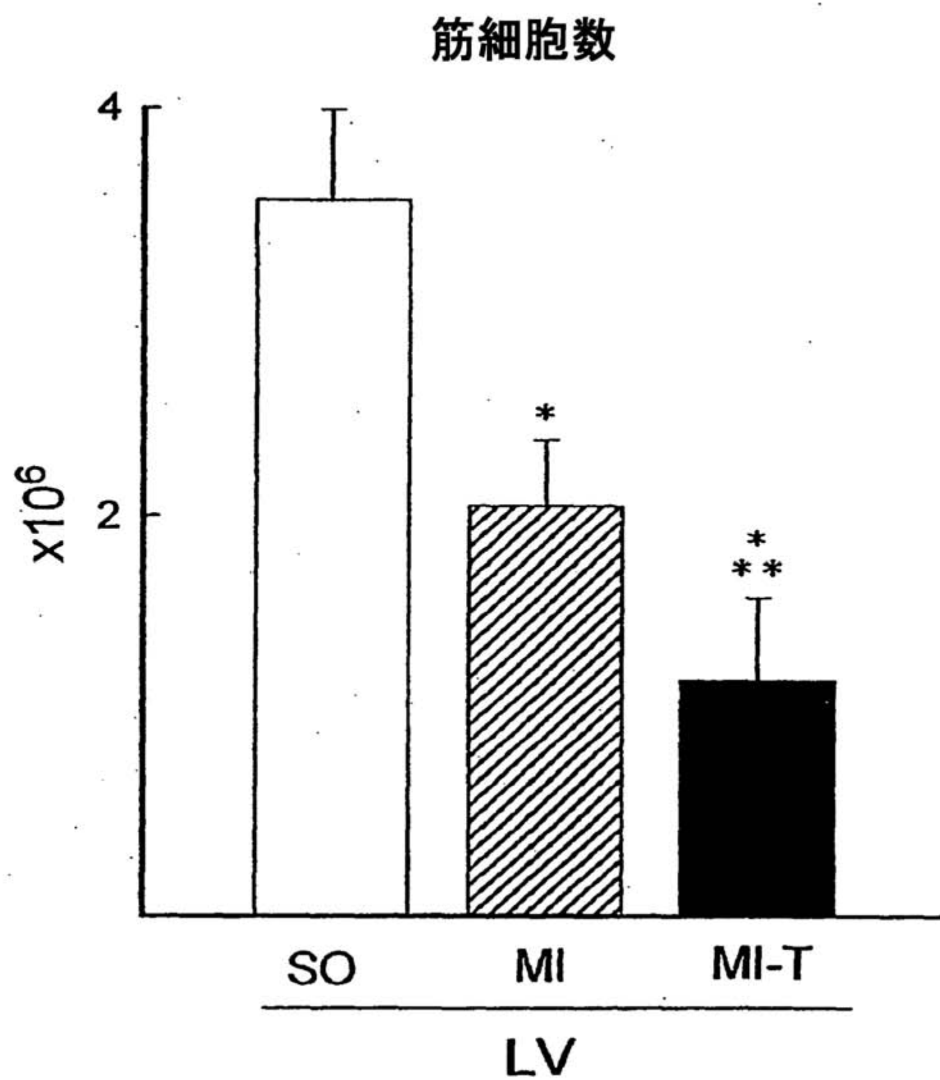
【図２２Ｍ】


生存可能c-kitPOS細胞
4000
2000
細胞数／100mm2
A LV
SO
A R B I
処置済
A R B I
未処置
死亡c-kitPOS細胞
450
225
細胞数／100mm2
A LV
SO
A R B I
処置済
A R B I
未処置

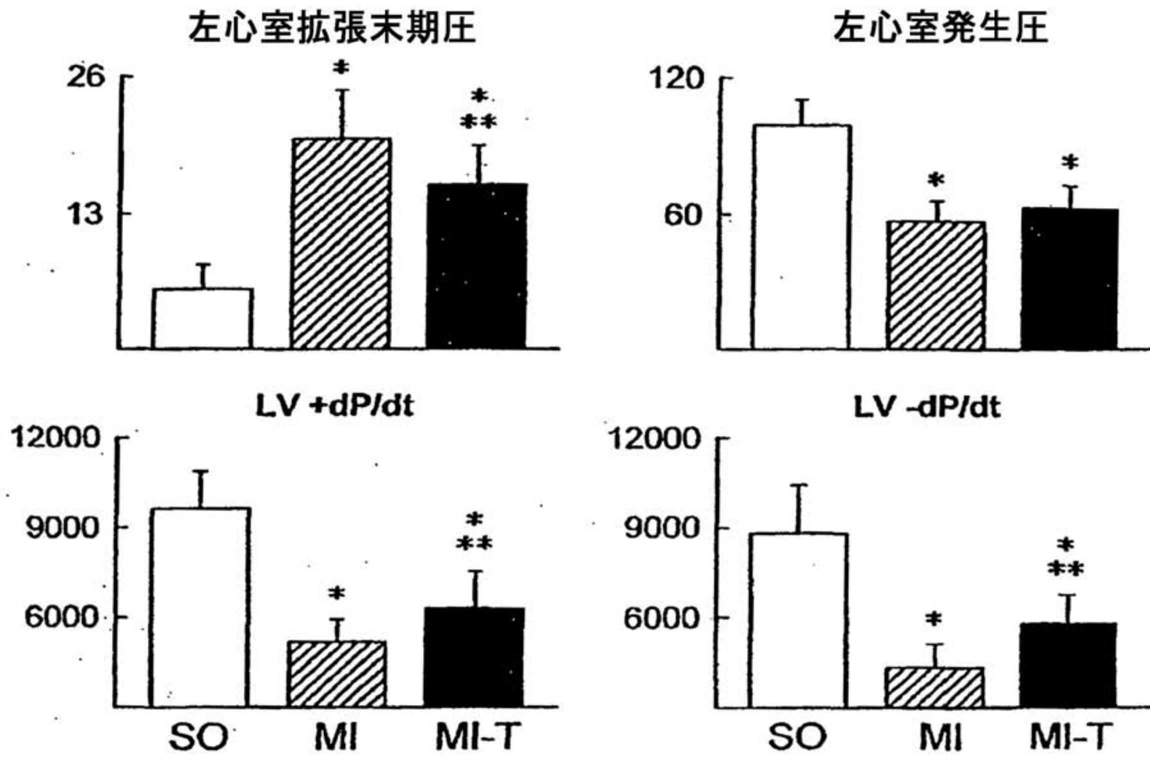
【図２２Ｎ】


生存可能MDR1POS細胞
細胞数／100mm2
3000
1500
A LV
SO
A R B I
処理済
A R B I
未処理
死亡MDR1POS細胞
細胞数／100mm2
450
225
A LV
SO
A R B I
処理済
A R B I
未処理

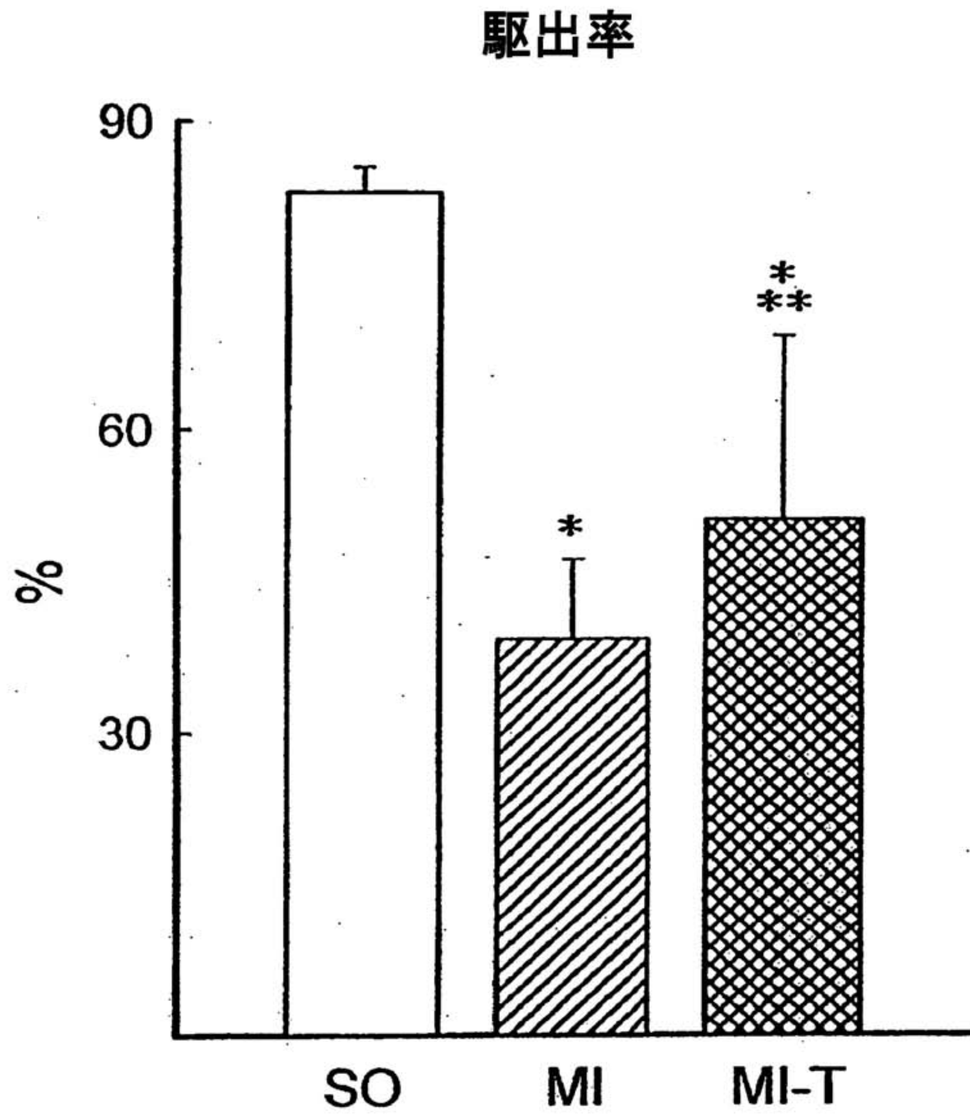
【図２３Ａ】



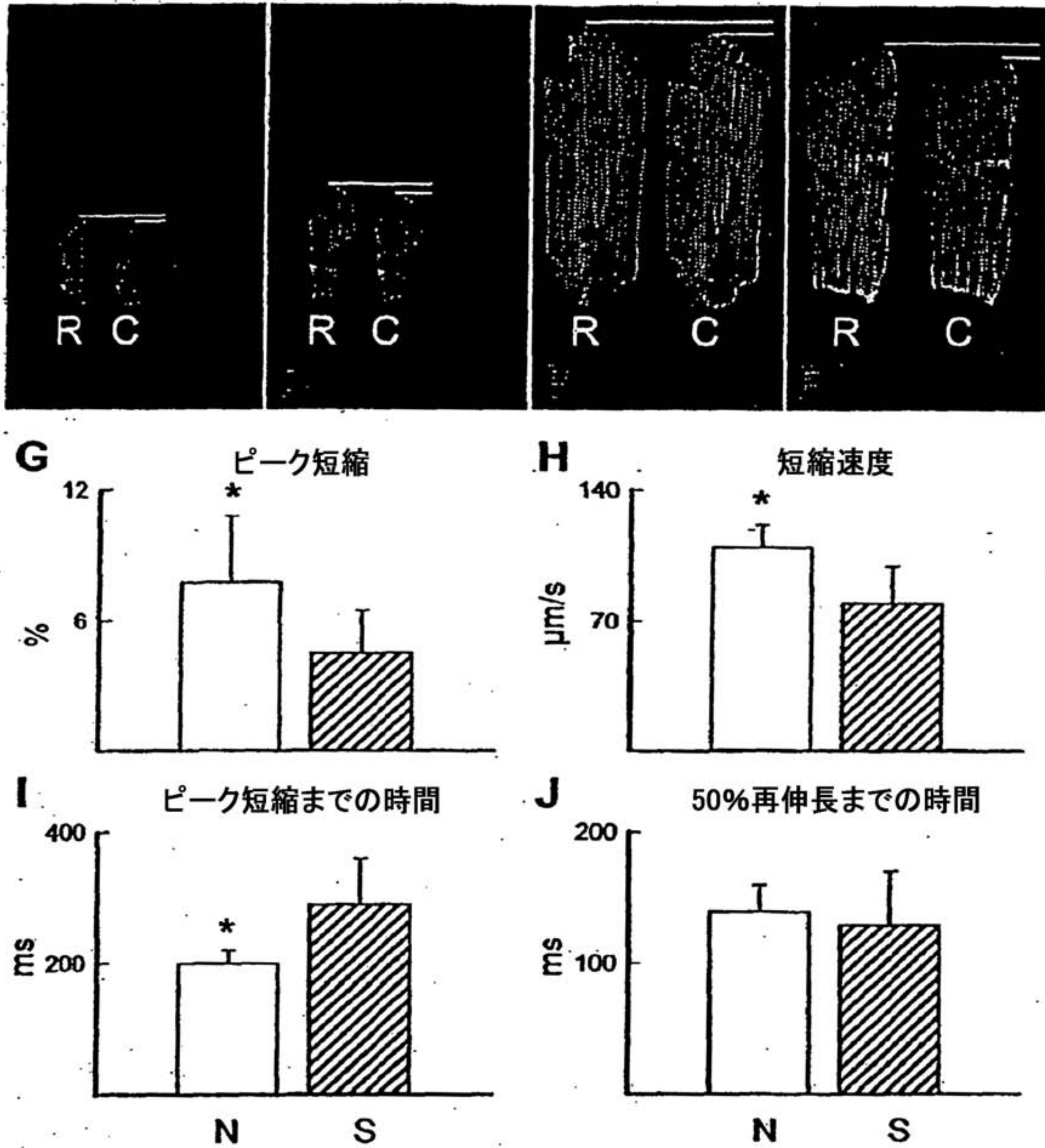
【図２３Ｂ】


左心室拡張末期圧
26
13
*
*
**
左心室発生圧
120
60
*
*
LV +dP/dt
12000
9000
6000
*
*
**
LV -dP/dt
12000
9000
6000
*
*
**
SO
MI
MI-T
SO
MI
MI-T

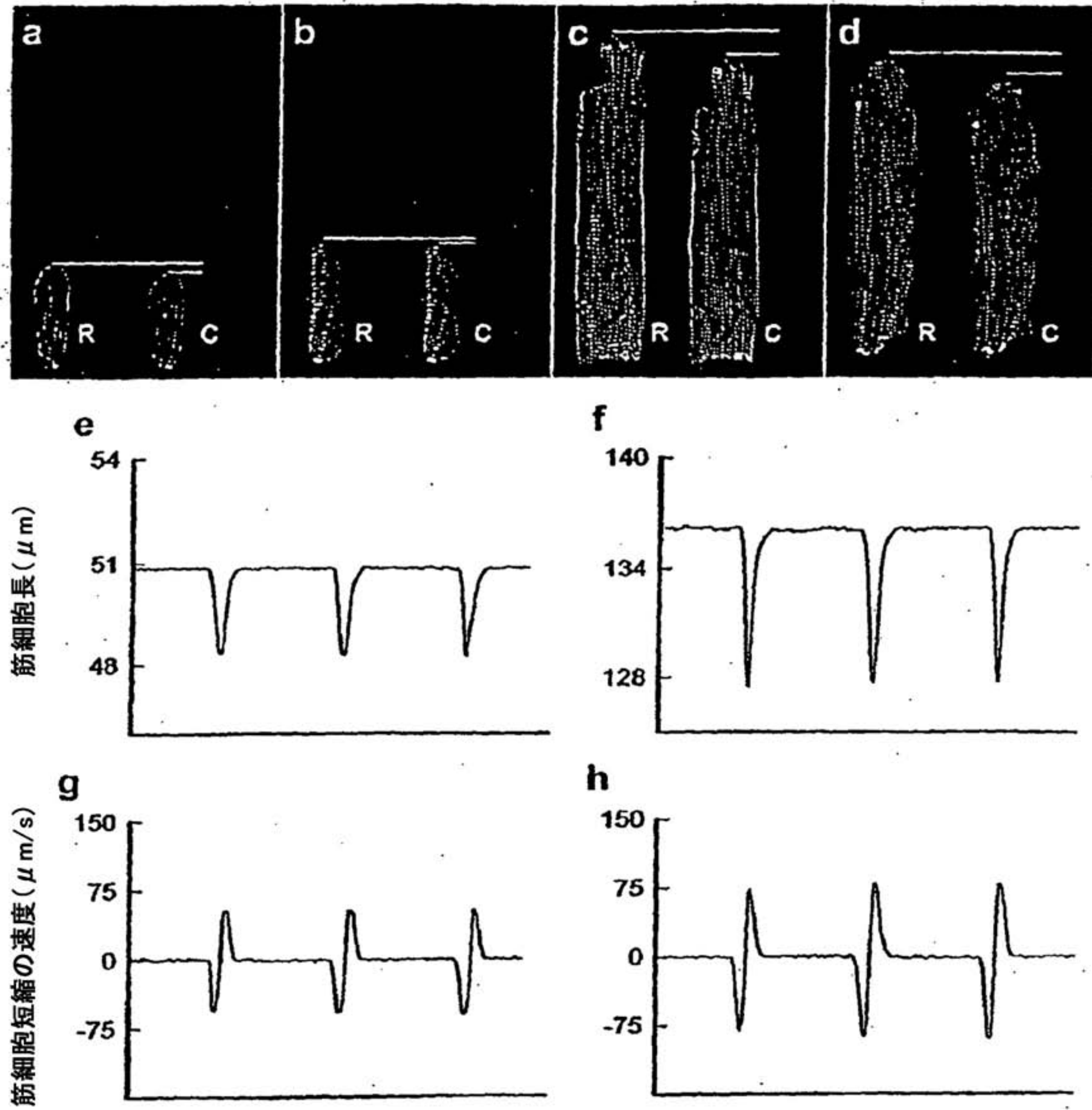
【図２４Ｅ】



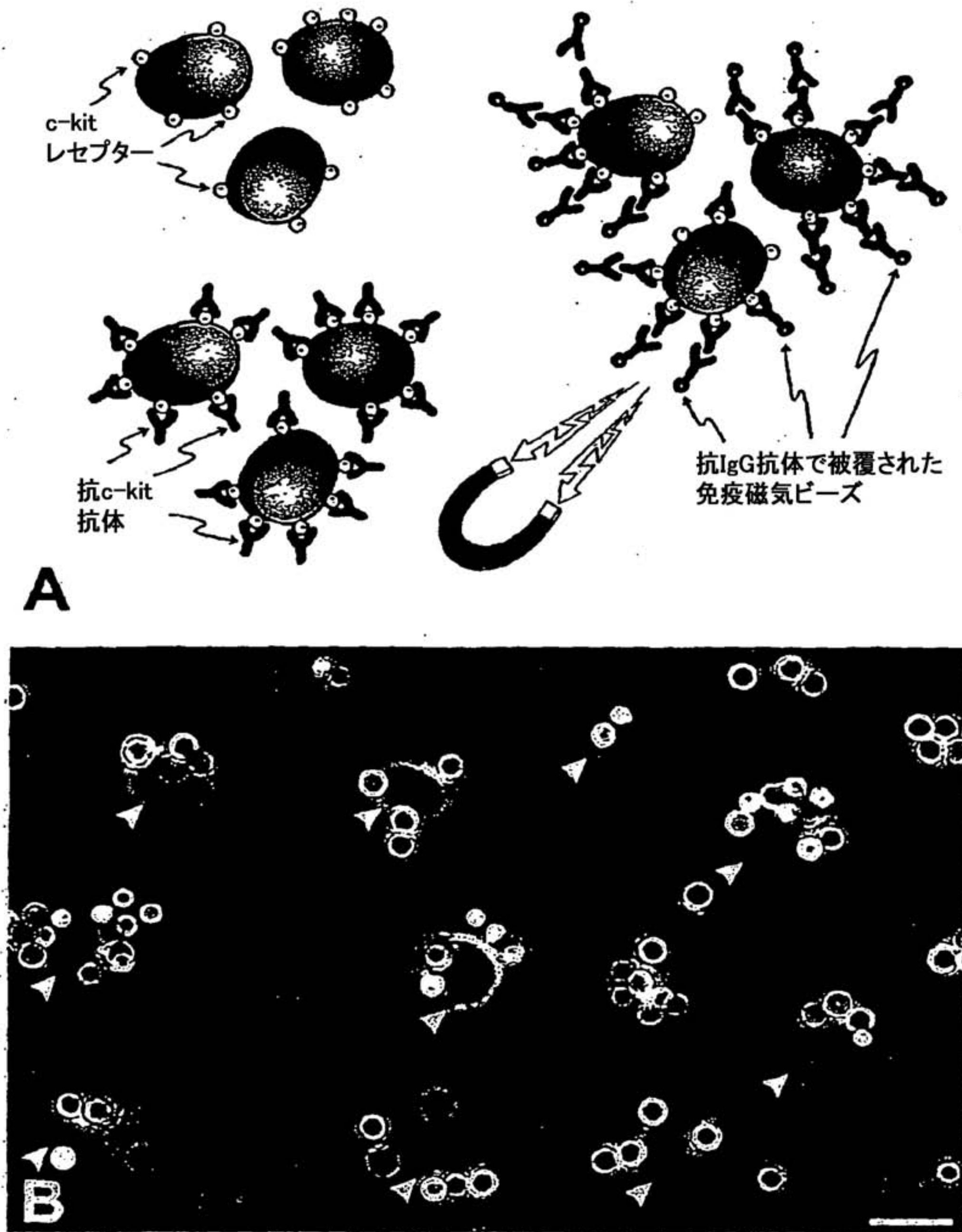
【図２５Ｃ－Ｊ】


R C
R C
R C
R C
G
ピーク短縮
12
6
%
*
H
短縮速度
140
70
μm/s
*
I
ピーク短縮までの時間
400
200
ms
*
J
50%再伸長までの時間
200
100
ms
N
S
N
S

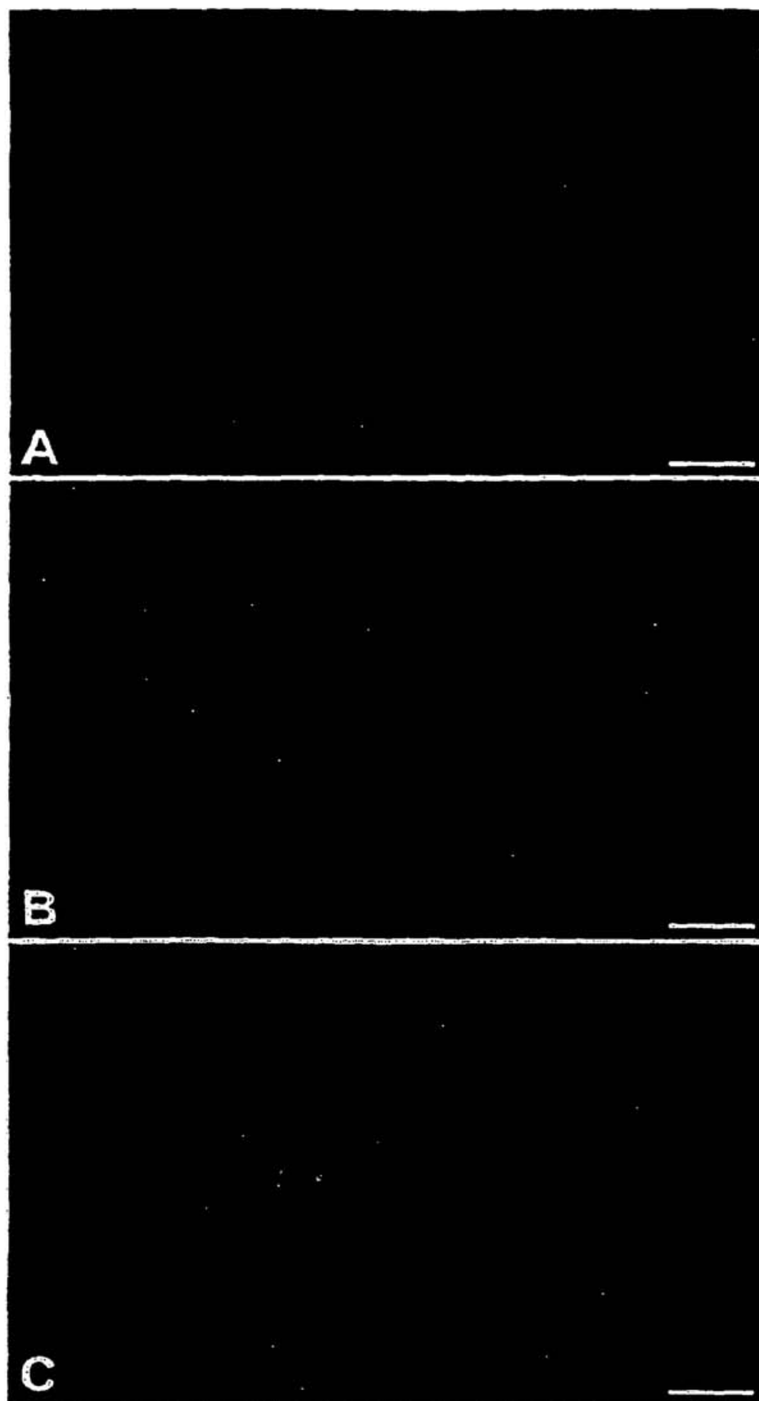
【図３３Ａ－Ｈ】


a
R
C
b
R
C
c
R
C
d
R
C
e
54
51
48
筋細胞長（μｍ）
f
140
134
128
g
150
75
0
-75
筋細胞短縮の速度（μｍ/s）
h
150
75
0
-75

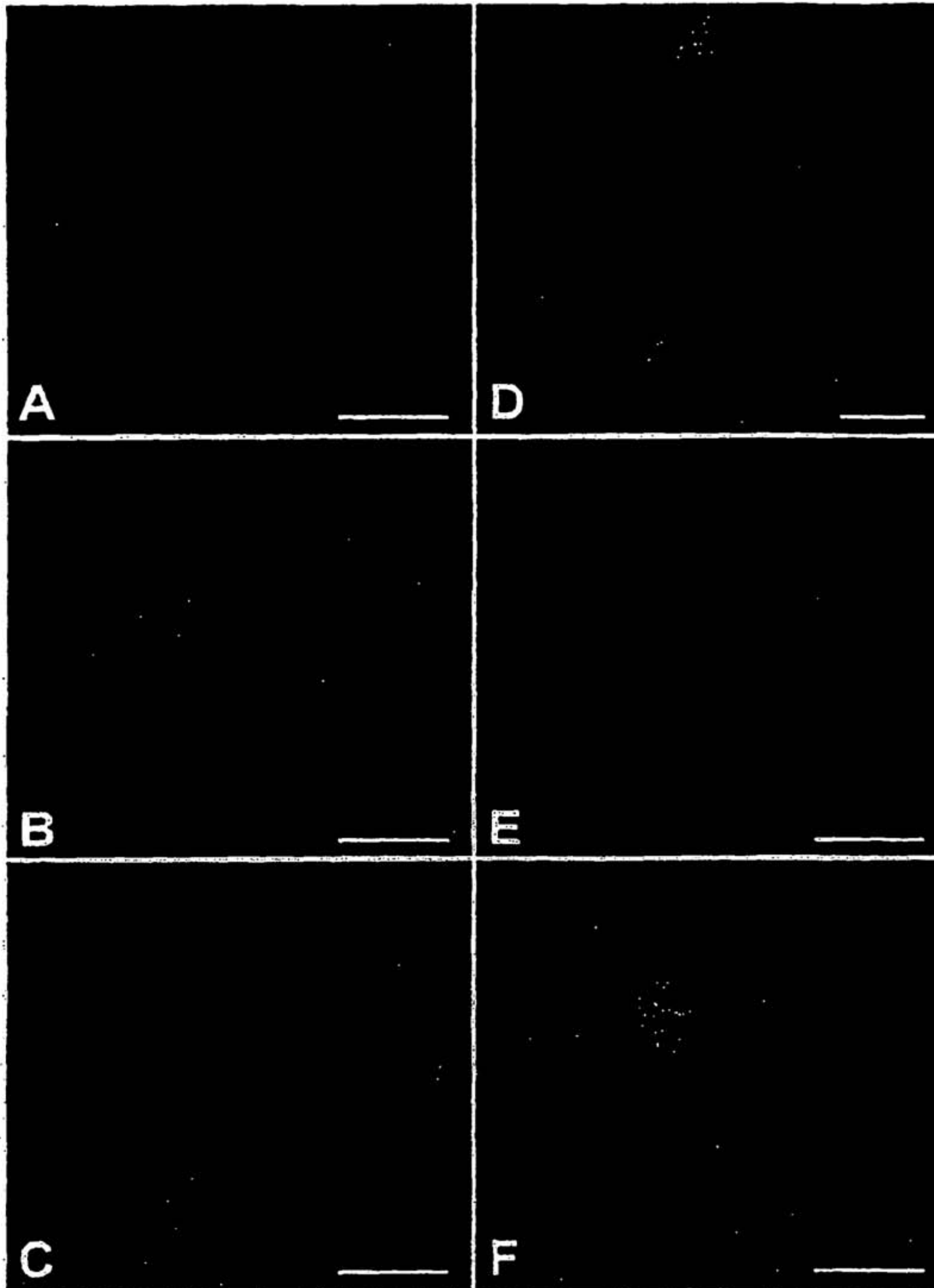
【図３６Ａ－Ｂ】



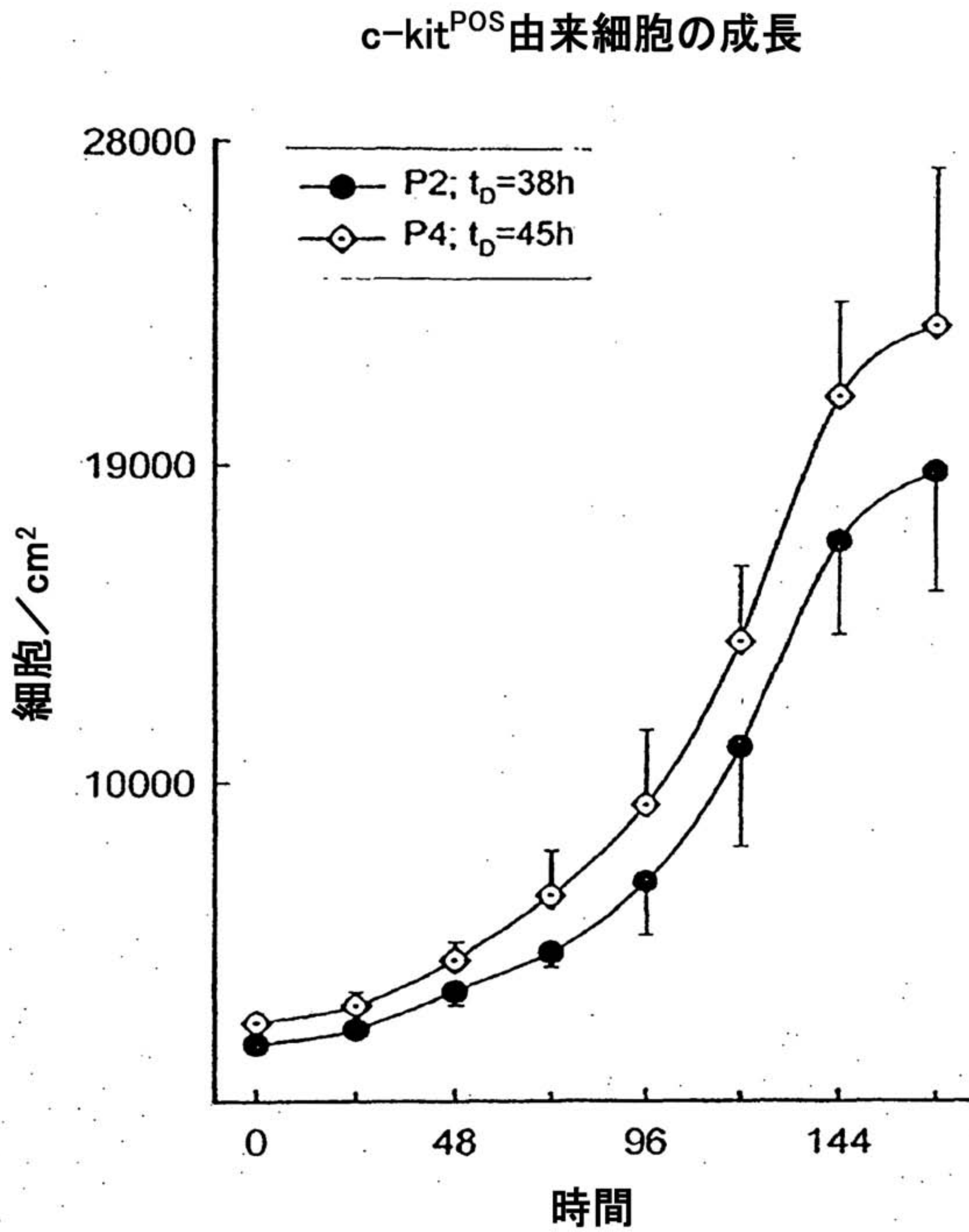
【図３８Ａ－Ｃ】



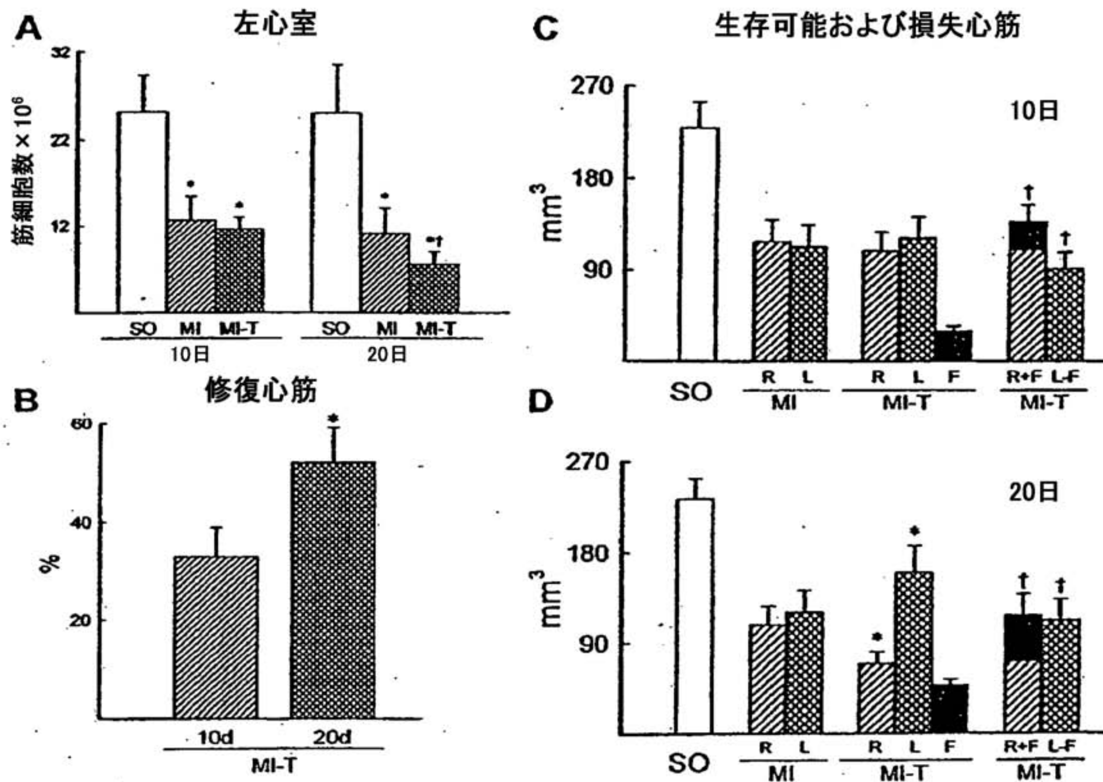
【図３９Ａ－Ｆ】



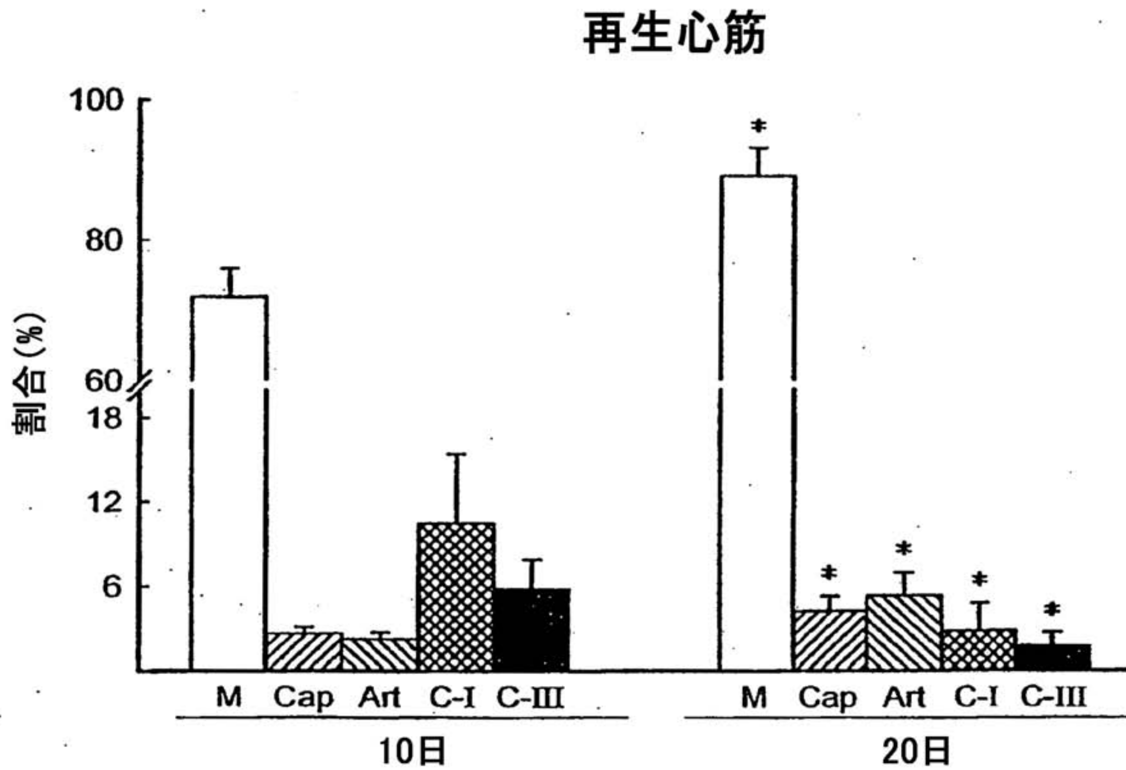
【図４２】


c-kit^POS由来細胞の成長
P2; tD=38h
P4; tD=45h
28000
19000
10000
細胞／cm2
0
48
96
144
時間

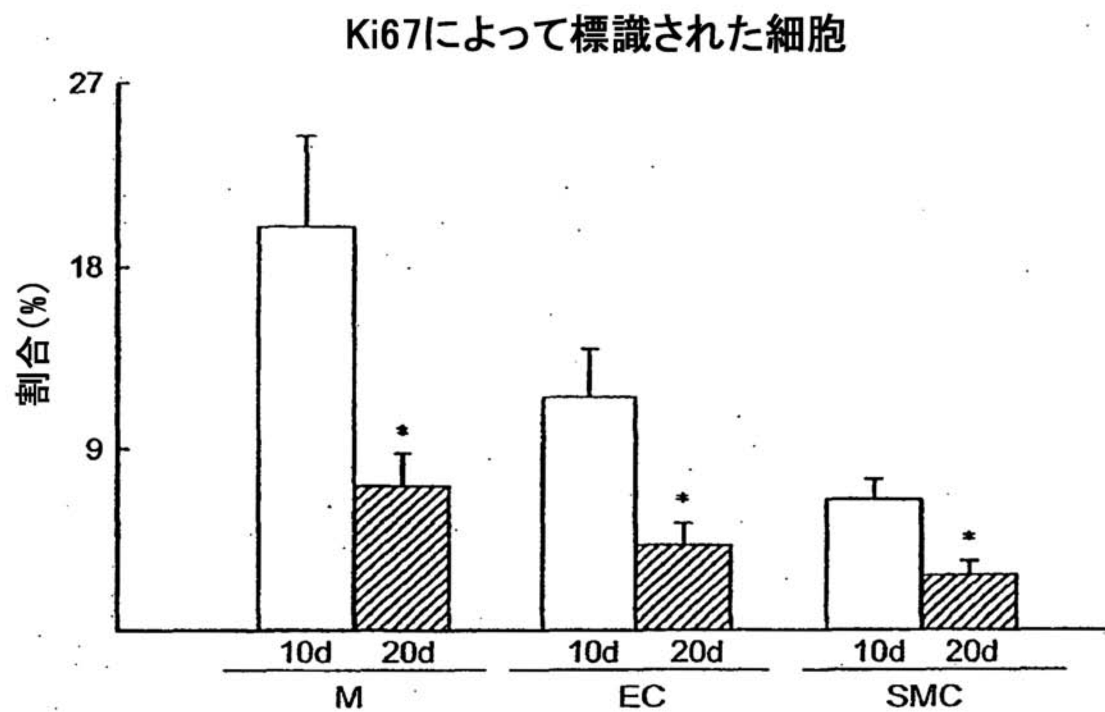
【図４８Ａ－Ｄ】


A
左心室
筋細胞数×10^6
32
22
12
SO MI MI-T SO MI MI-T
10日 20日
B
修復心筋
%
60
40
20
10d 20d
MI-T
C
生存可能および損失心筋
mm3
270
180
90
10日
SO
R L R L F R+F L-F
MI MI-T MI-T
D
270
180
90
20日
SO
R L R L F R+F L-F
MI MI-T MI-T

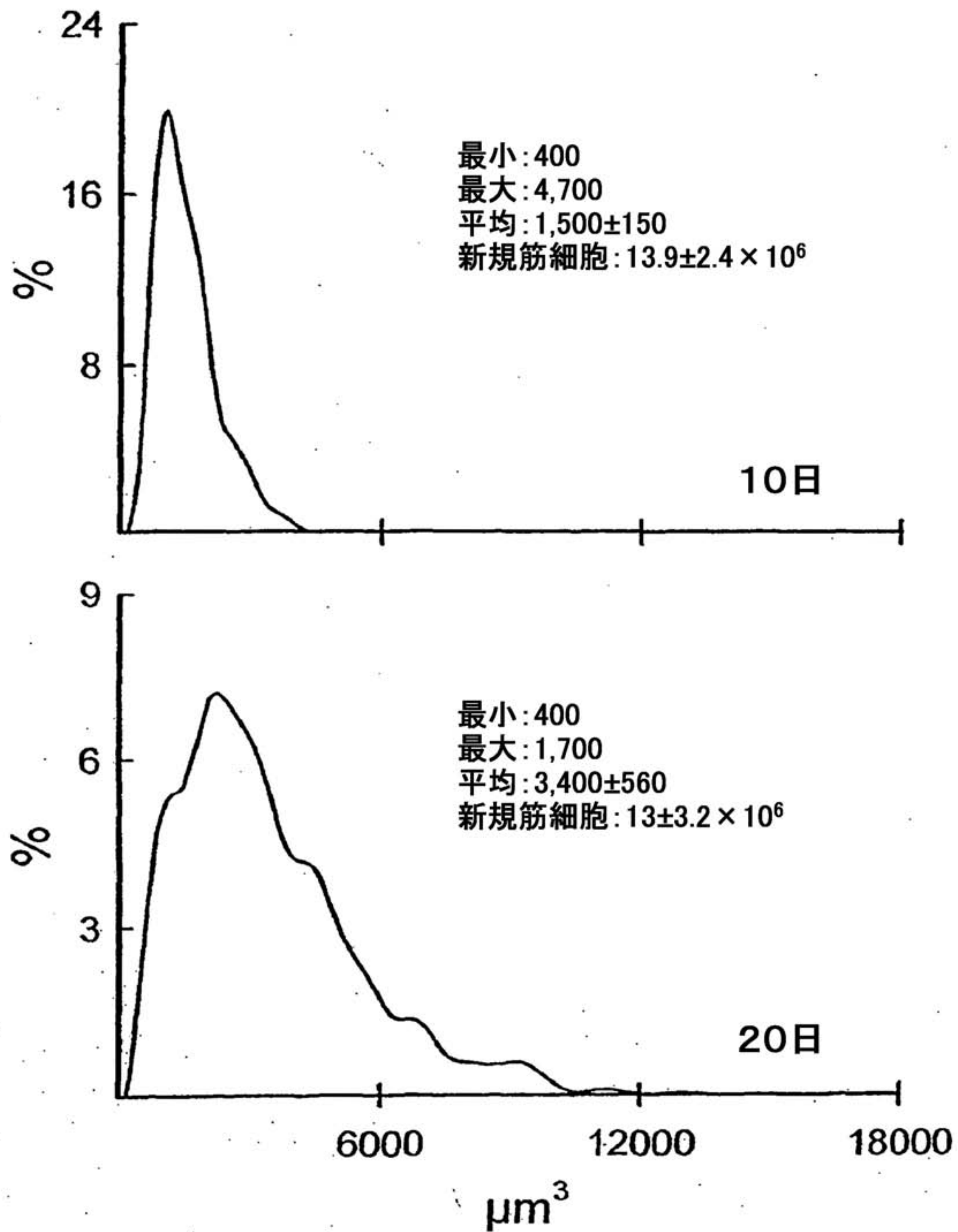
【図５１】


再生心筋
割合(%)
100
80
60
18
12
6
M Cap Art C-I C-III
10日
M Cap Art C-I C-III
20日

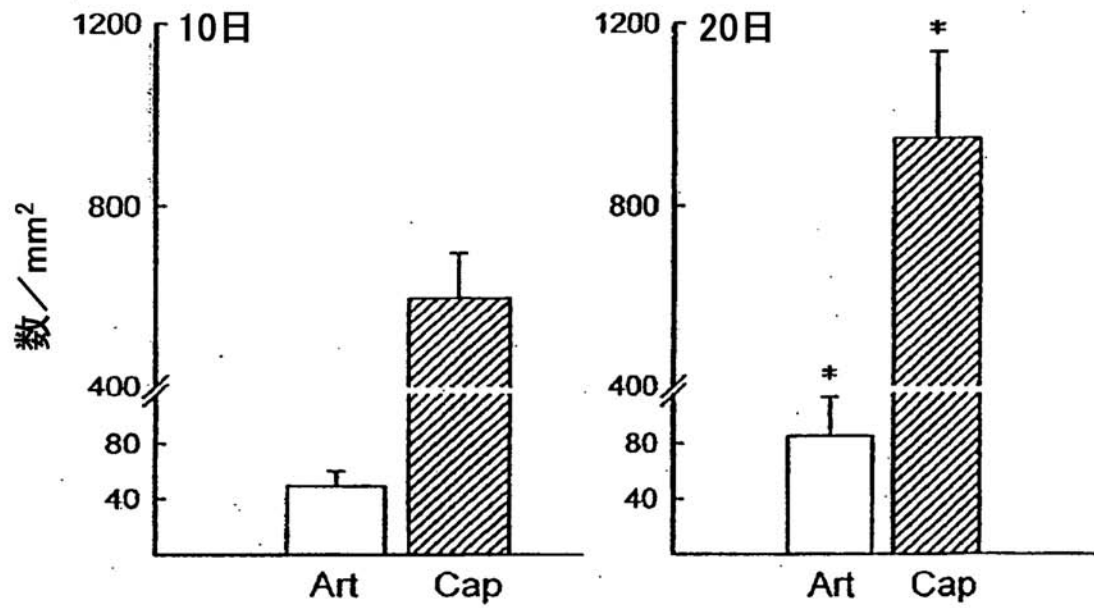
【図５２】



【図５４】

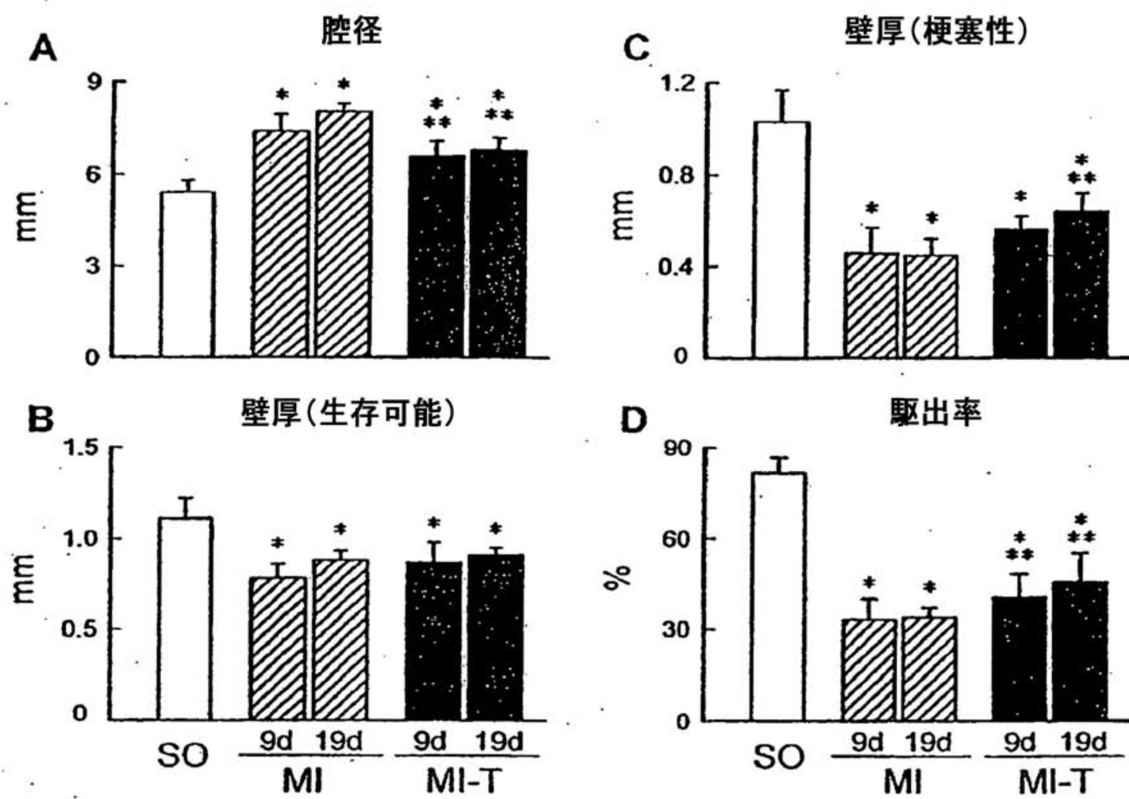

筋細胞の容積および数
24
16
8
%
最小:400
最大:4,700
平均:1,500±150
新規筋細胞:13.9±2.4×10^6
10日
9
6
3
%
最小:400
最大:1,700
平均:3,400±560
新規筋細胞:13±3.2×10^6
20日
6000
12000
18000
μm^3

【図５５】



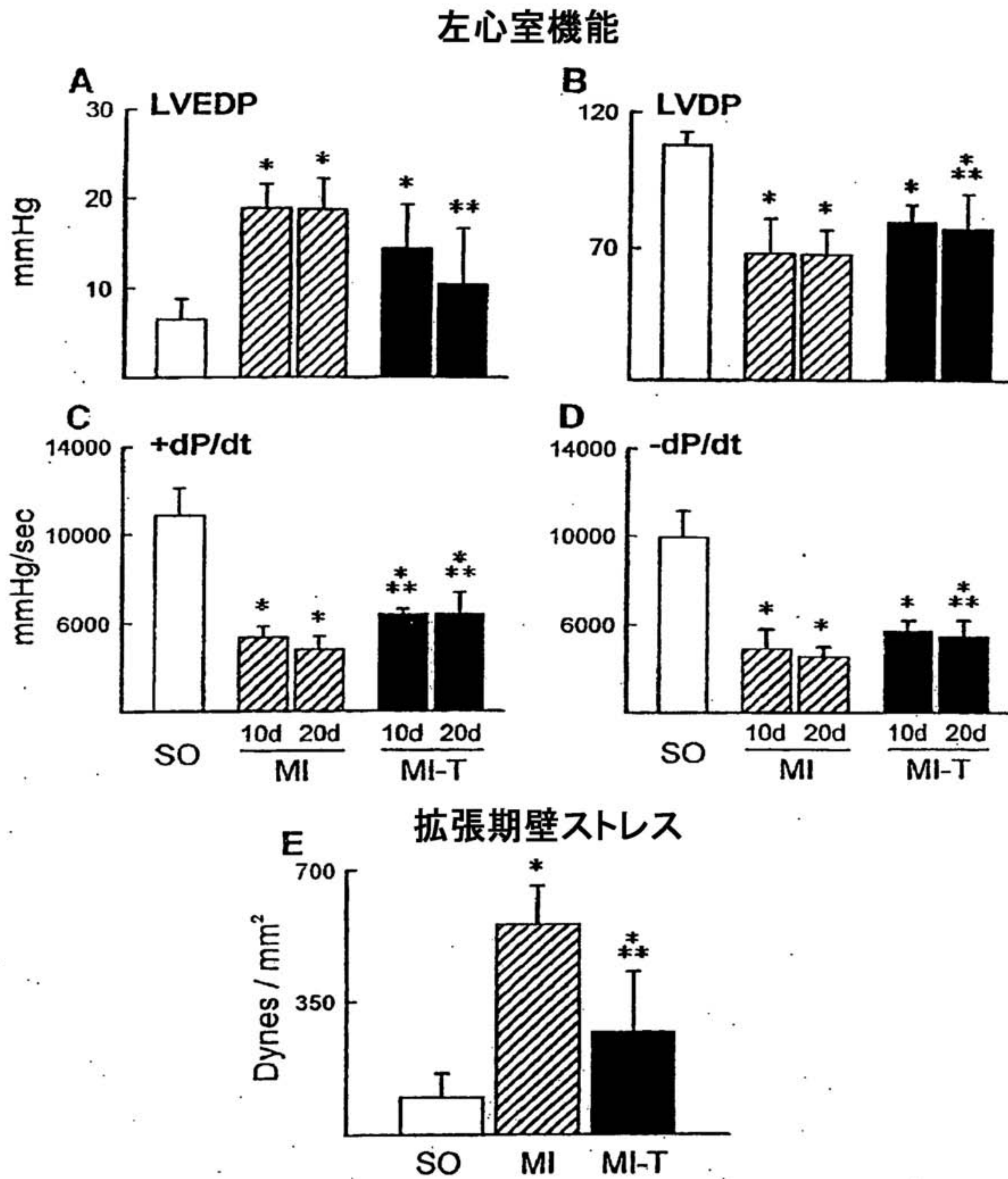
10日
20日
1200
800
400
80
40
数／mm²
Art
Cap

【図５７Ａ－Ｄ】



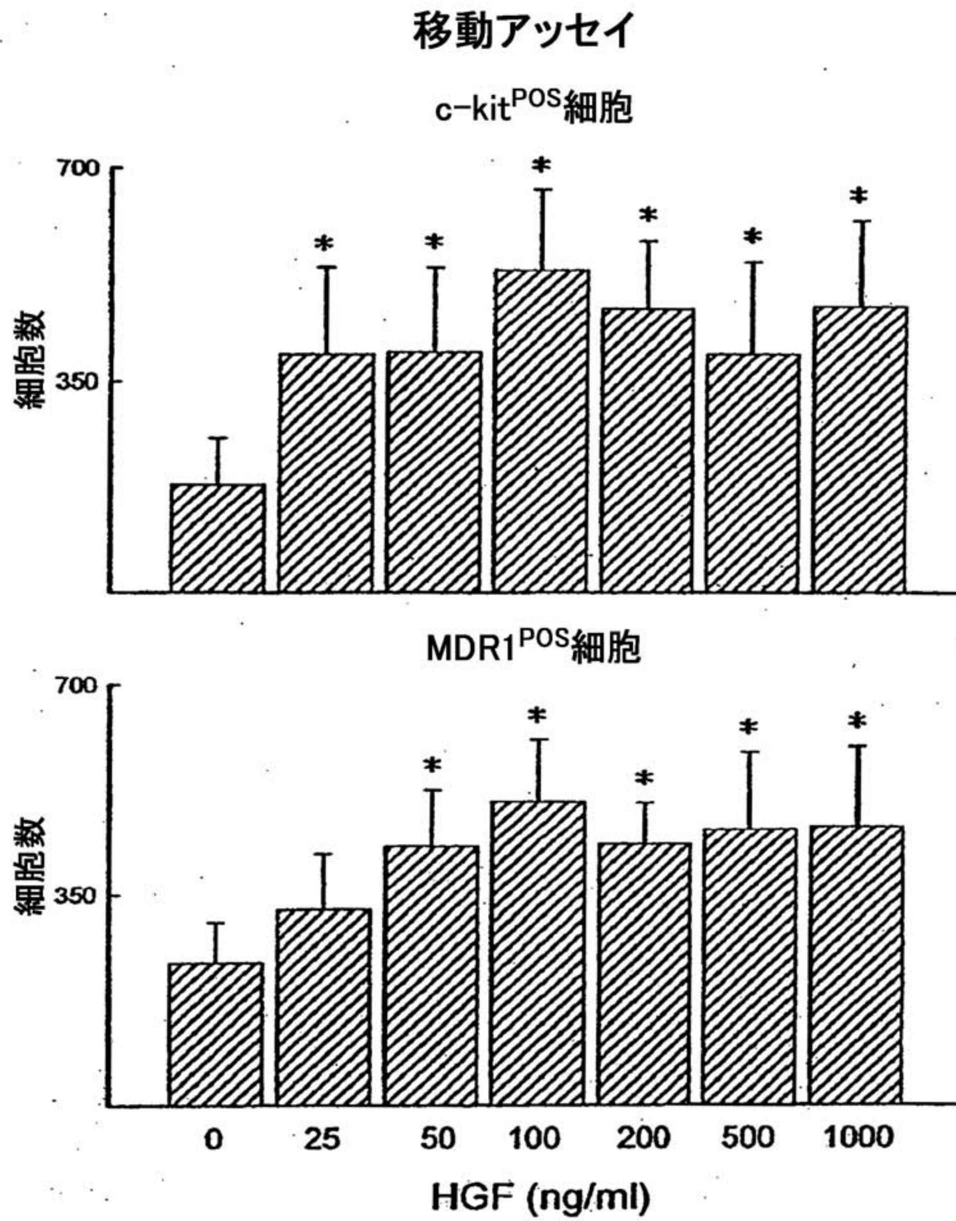
A
腔径
mm
C
壁厚(梗塞性)
mm
B
壁厚(生存可能)
mm
D
駆出率
%
SO
9d
19d
MI
MI-T

【図５９Ａ－Ｅ】

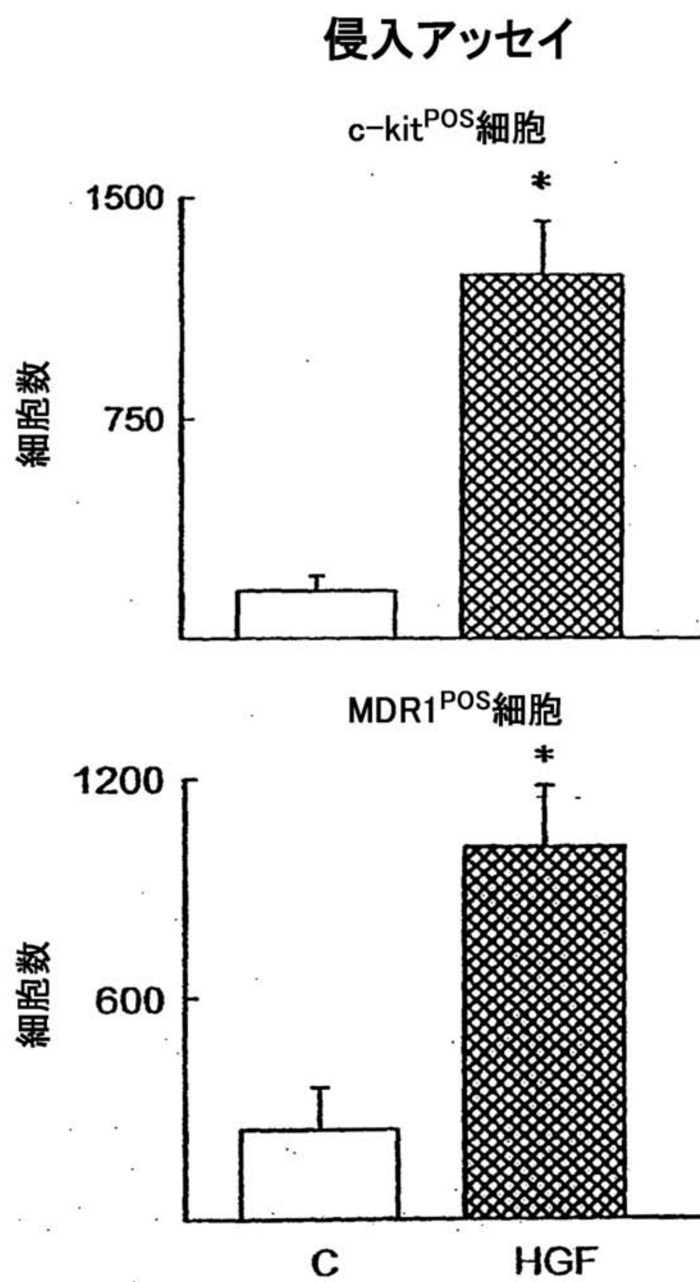


左心室機能
A
LVEDP
30
20
10
mmHg
B
LVDP
120
70
C
+dP/dt
14000
10000
6000
mmHg/sec
D
-dP/dt
14000
10000
6000
SO
10d 20d
MI
10d 20d
MI-T
拡張期壁ストレス
E
700
350
Dynes / mm2
SO
MI
MI-T

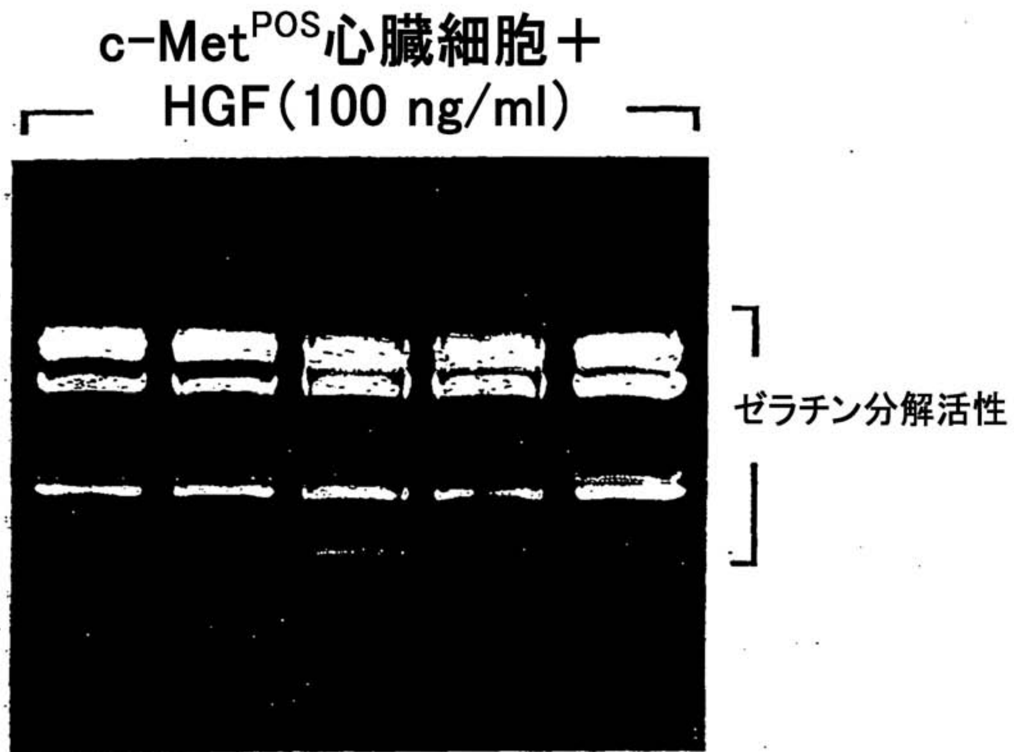
【図６１】


移動アッセイ
c-kitPOS細胞
700
350
細胞数
*
MDR1POS細胞
700
350
細胞数
*
0
25
50
100
200
500
1000
HGF (ng/ml)

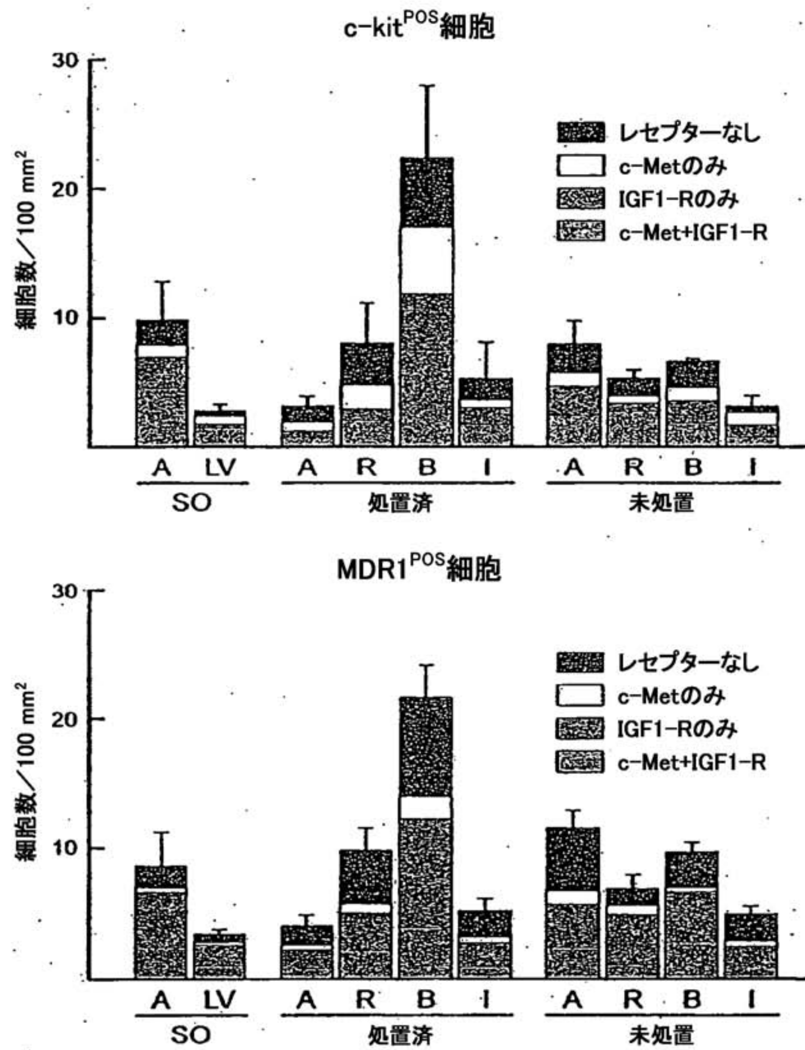
【図６２】



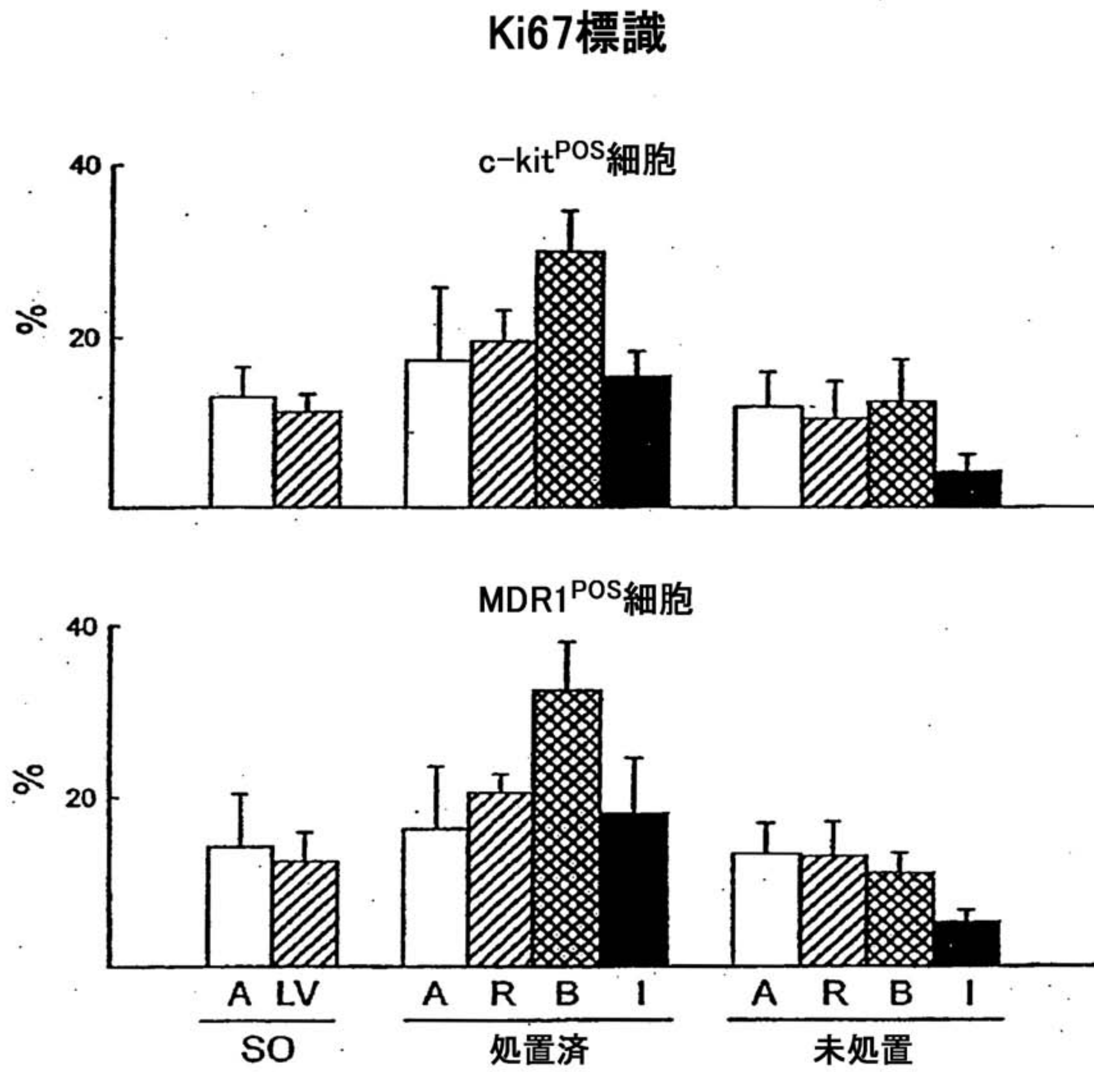
【図６３】



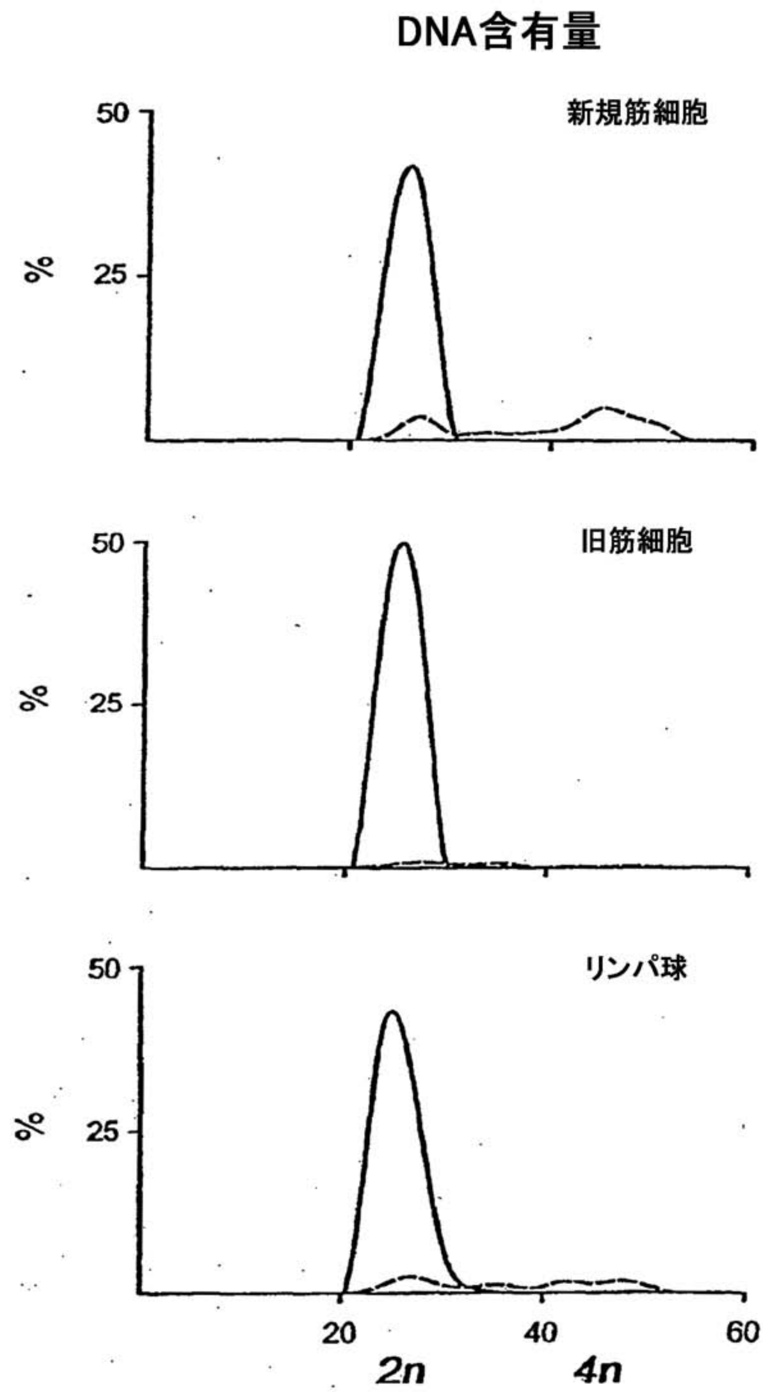
【図６４】


c-kit^POS細胞
30
20
10
細胞数／100 mm²
レセプターなし
c-Metのみ
IGF1-Rのみ
c-Met+IGF1-R
A LV A R B I A R B I
SO
処置済
未処置
MDR1^POS細胞
30
20
10
細胞数／100 mm²
レセプターなし
c-Metのみ
IGF1-Rのみ
c-Met+IGF1-R
A LV A R B I A R B I
SO
処置済
未処置

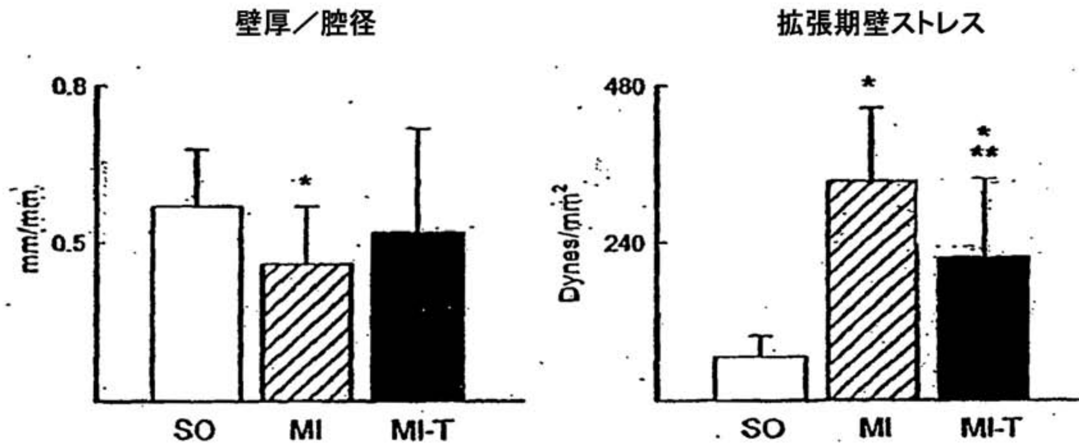
【図６５】


Ki67標識
c-kit^POS細胞
40
20
%
MDR1^POS細胞
40
20
%
A LV
SO
A R B I
処置済
A R B I
未処置

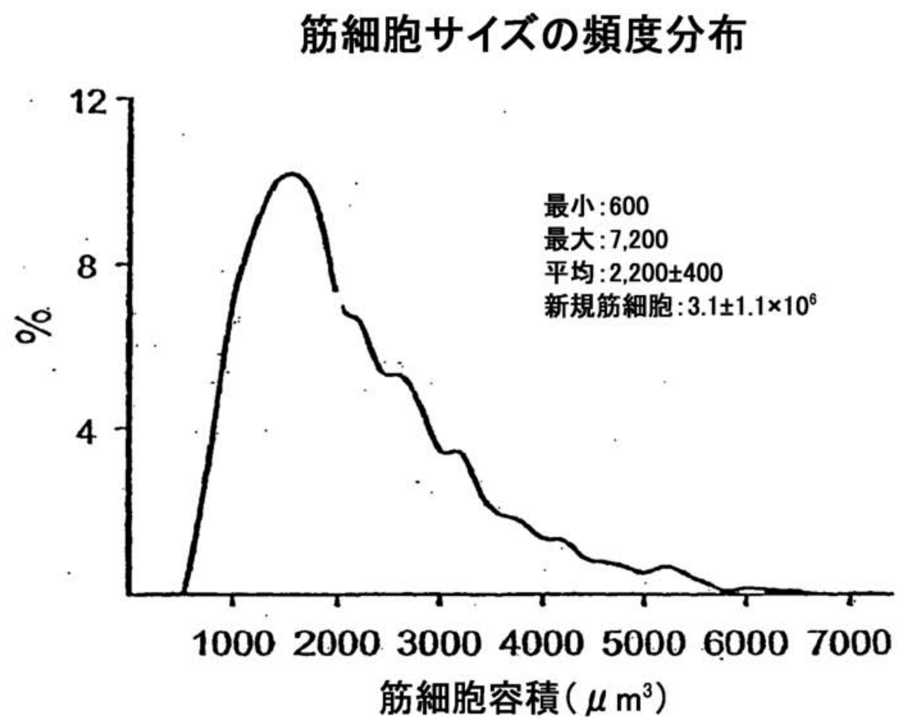
【図６６】



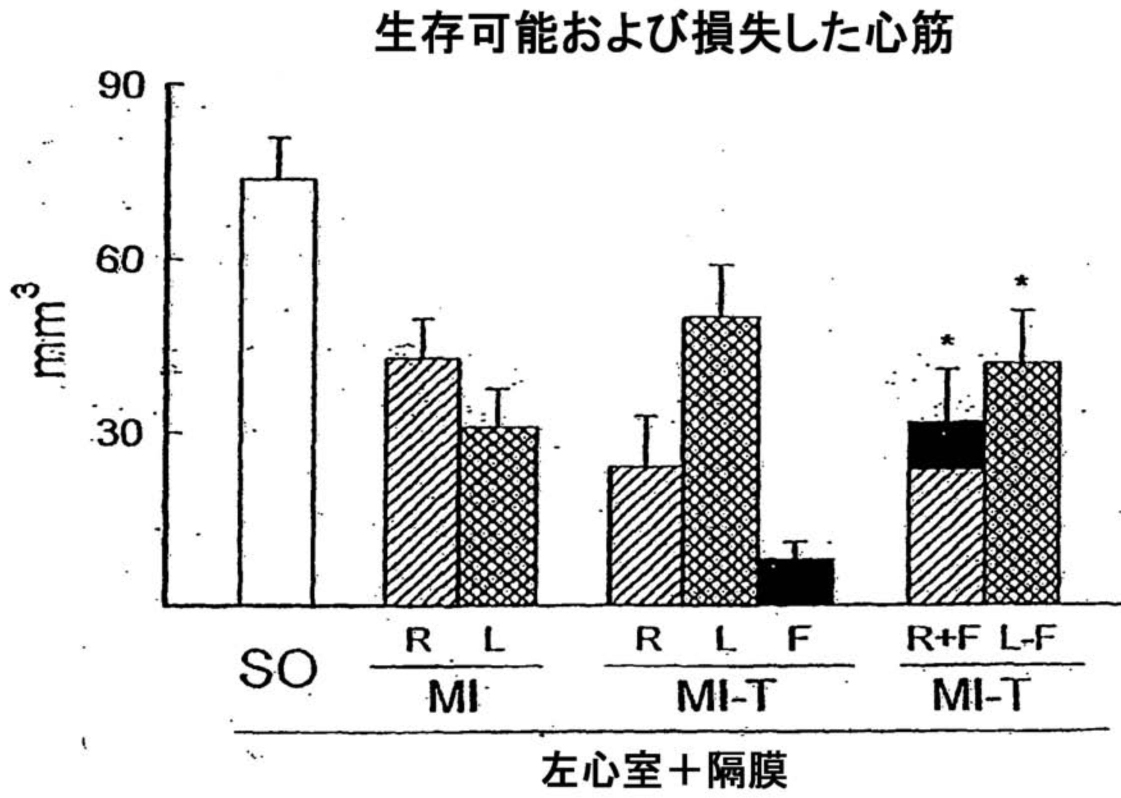
【図６７】


壁厚／腔径
0.8
0.5
mm/mm
*
SO
MI
MI-T
拡張期壁ストレス
480
240
Dynes/mm2
*
*
**
SO
MI
MI-T

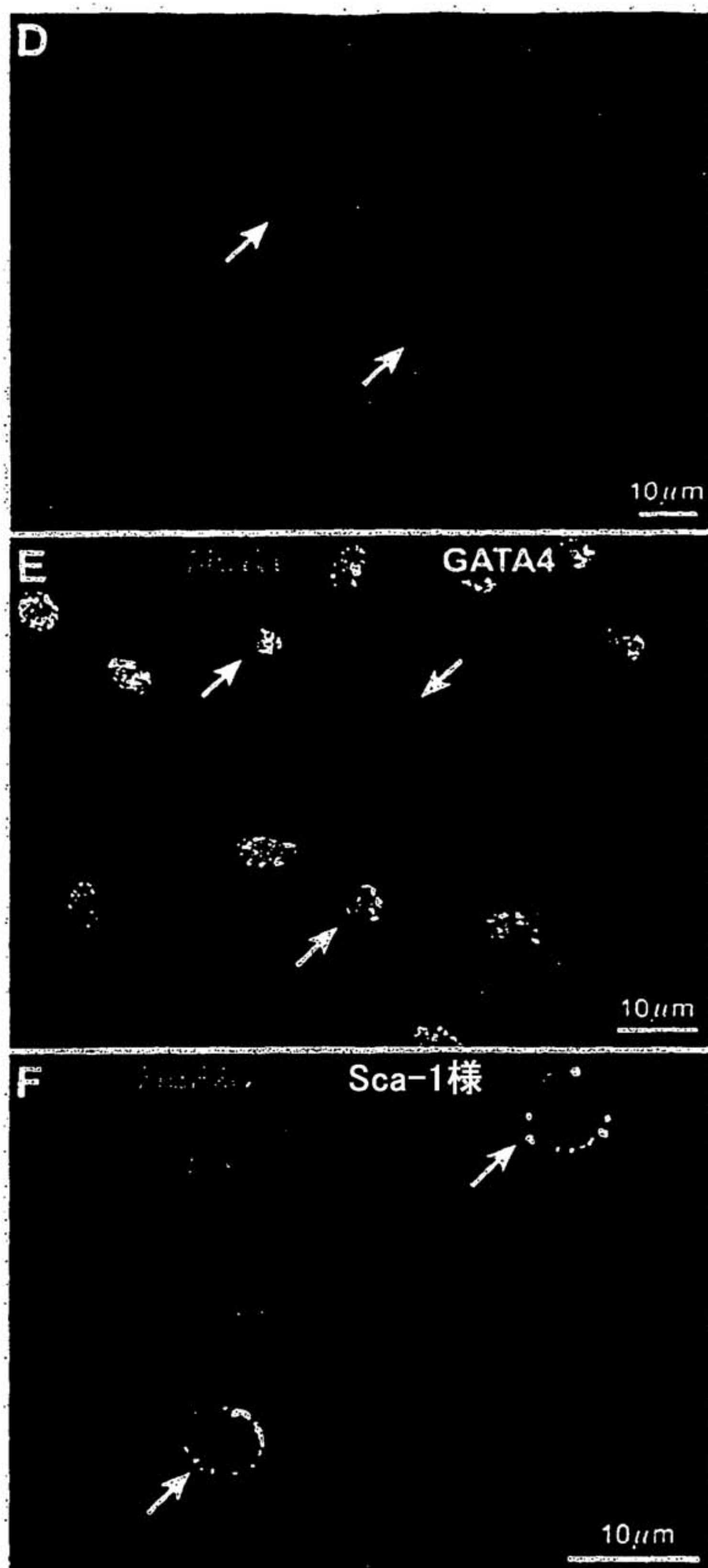
【図６８】


筋細胞サイズの頻度分布
12
8
4
%
最小:600
最大:7,200
平均:2,200±400
新規筋細胞:3.1±1.1×10⁶
1000 2000 3000 4000 5000 6000 7000
筋細胞容積(μm³)

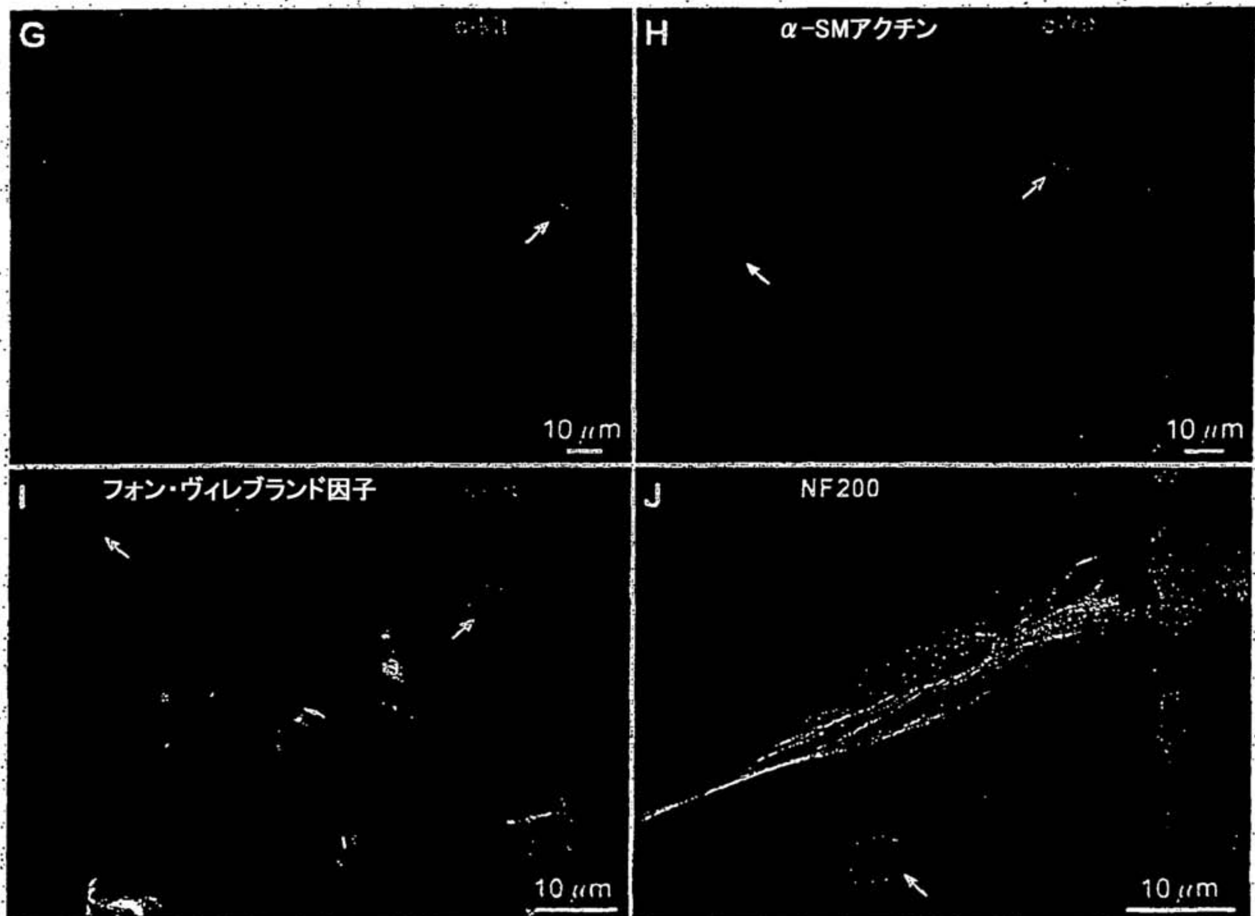
【図６９】



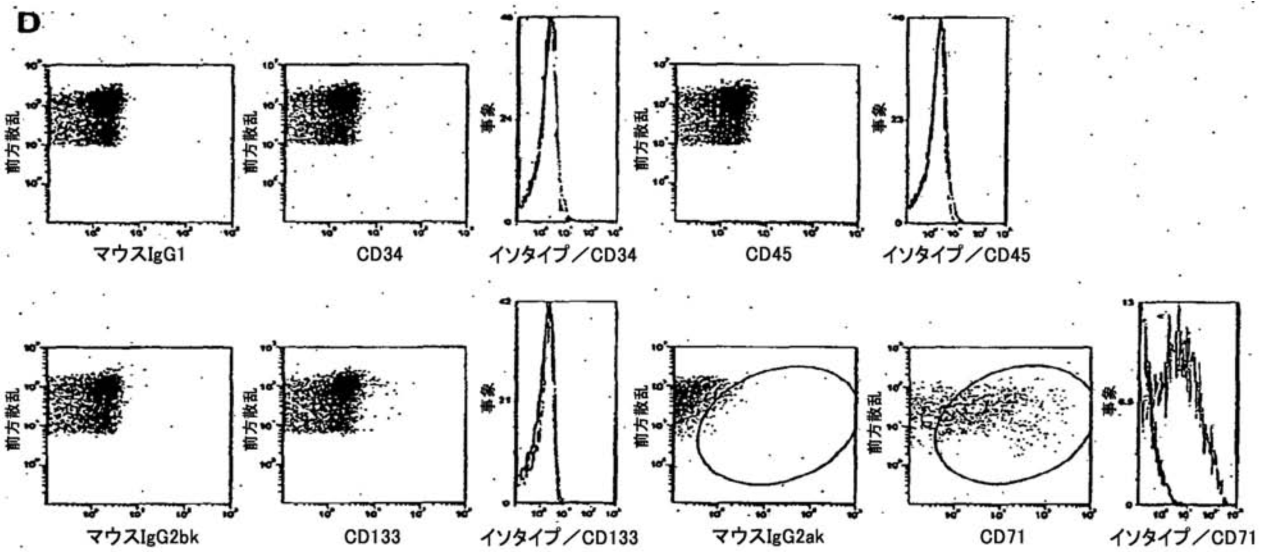
【図７０Ｄ－Ｆ】



【図７０Ｇ－Ｊ】

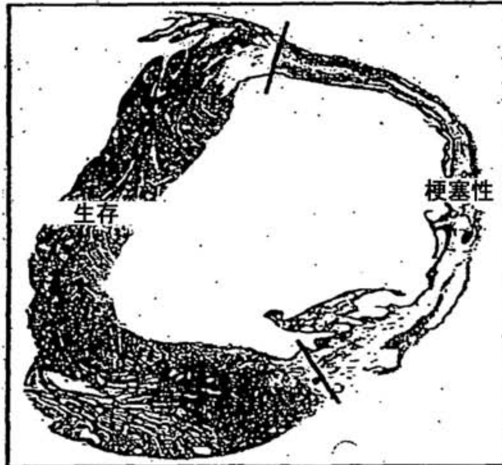

G
H
α-SMアクチン
10 μm
10 μm
I
フォン・ヴィレブランド因子
J
NF200
10 μm
10 μm

【図７１Ｄ】

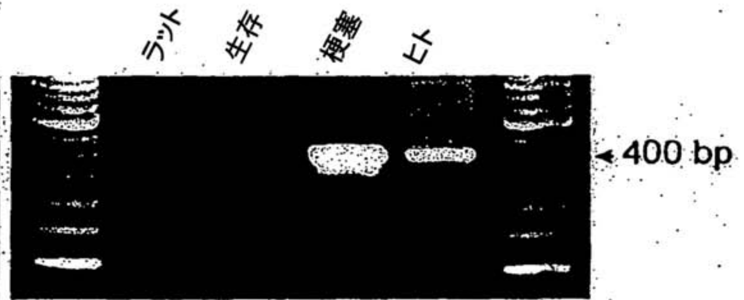

D
前方散乱
事象
マウスIgG1
CD34
イソタイプ／CD34
CD45
イソタイプ／CD45
マウスIgG2bk
CD133
イソタイプ／CD133
マウスIgG2ak
CD71
イソタイプ／CD71

【図７２Ｄ】

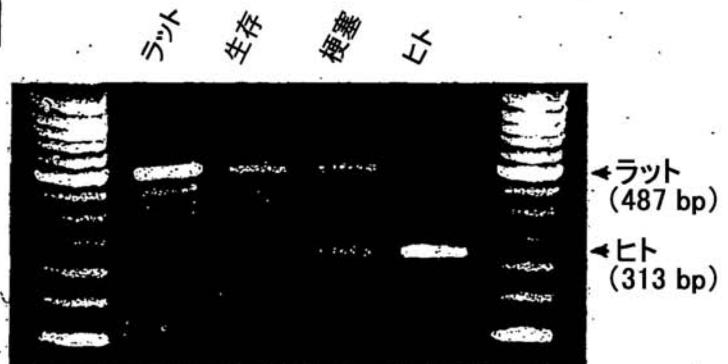
D



H&E

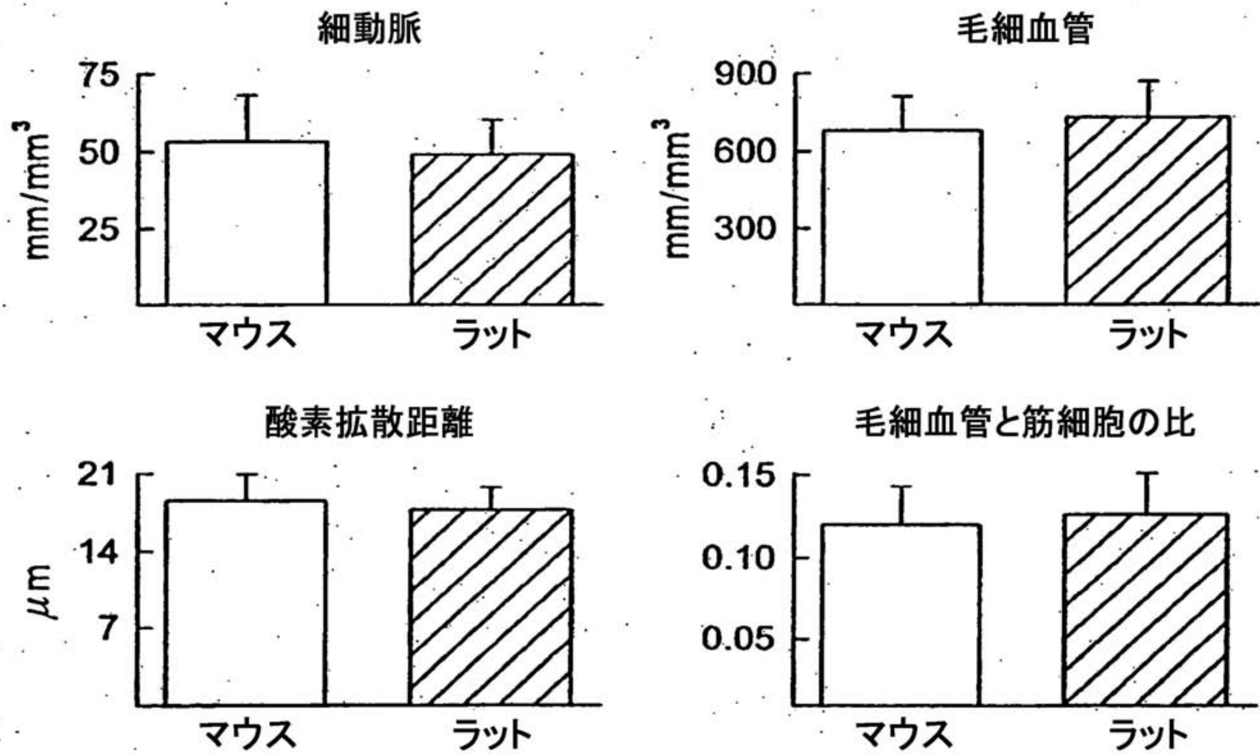


Alu DNA配列

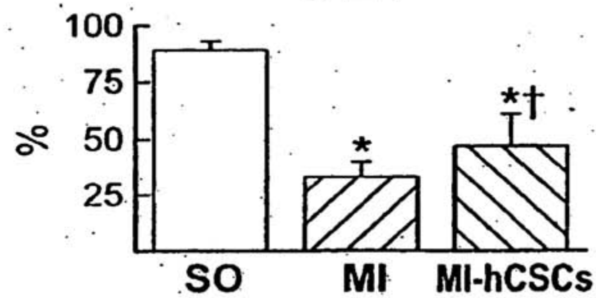


ミオシン軽鎖2v遺伝子

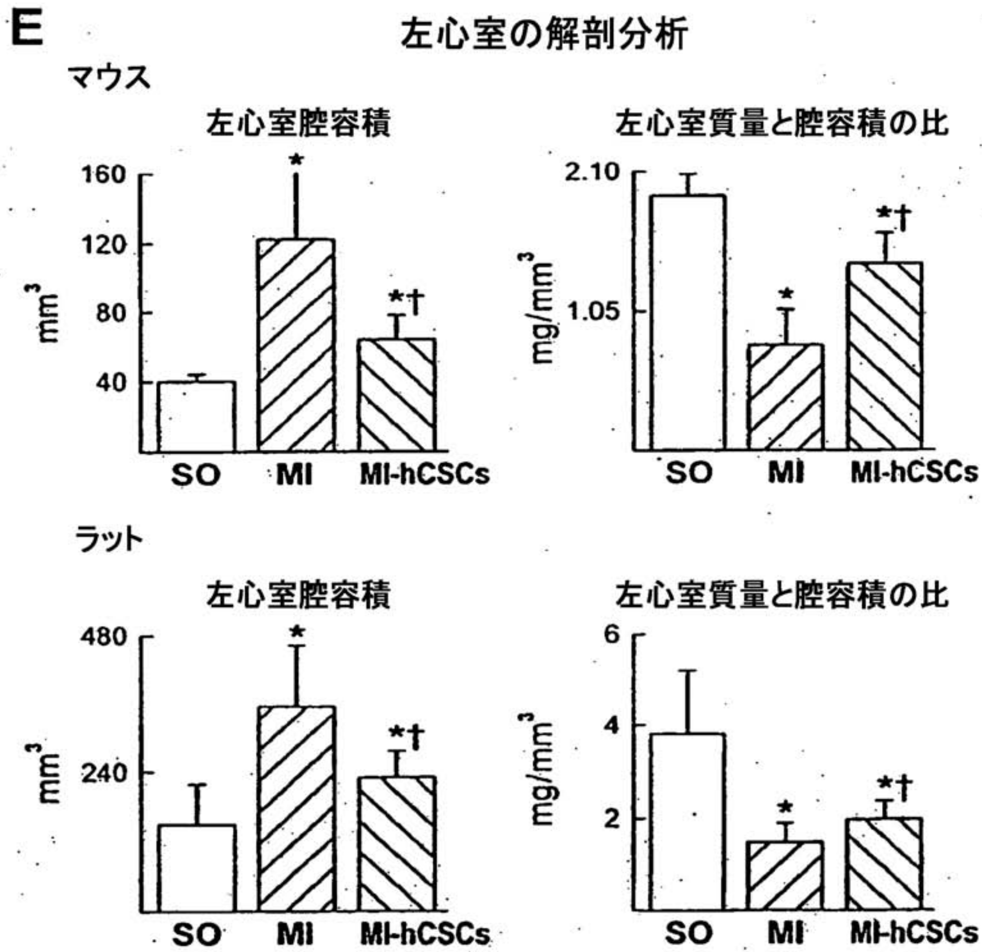
【図７３Ｇ】


G
血管形成
細動脈
mm/mm3
75
50
25
マウス
ラット
毛細血管
mm/mm3
900
600
300
マウス
ラット
酸素拡散距離
μm
21
14
7
マウス
ラット
毛細血管と筋細胞の比
0.15
0.10
0.05
マウス
ラット

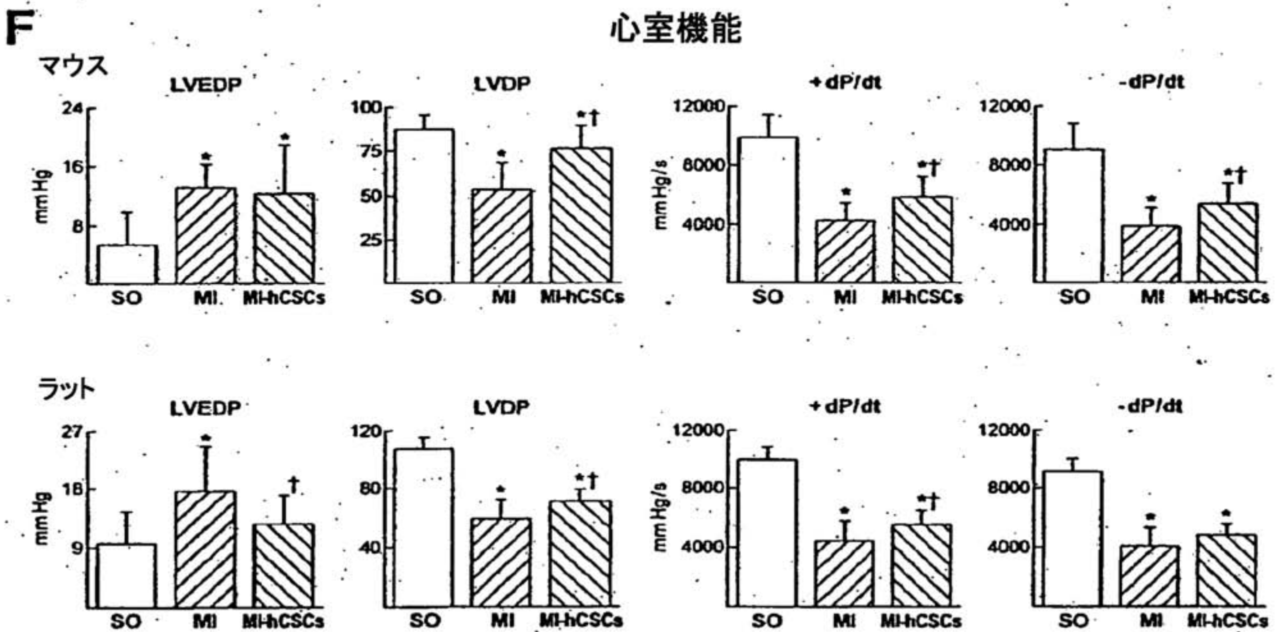
【図７４Ｄ】


D
駆出率
%
100
75
50
25
*
*†
SO
MI
MI-hCSCs

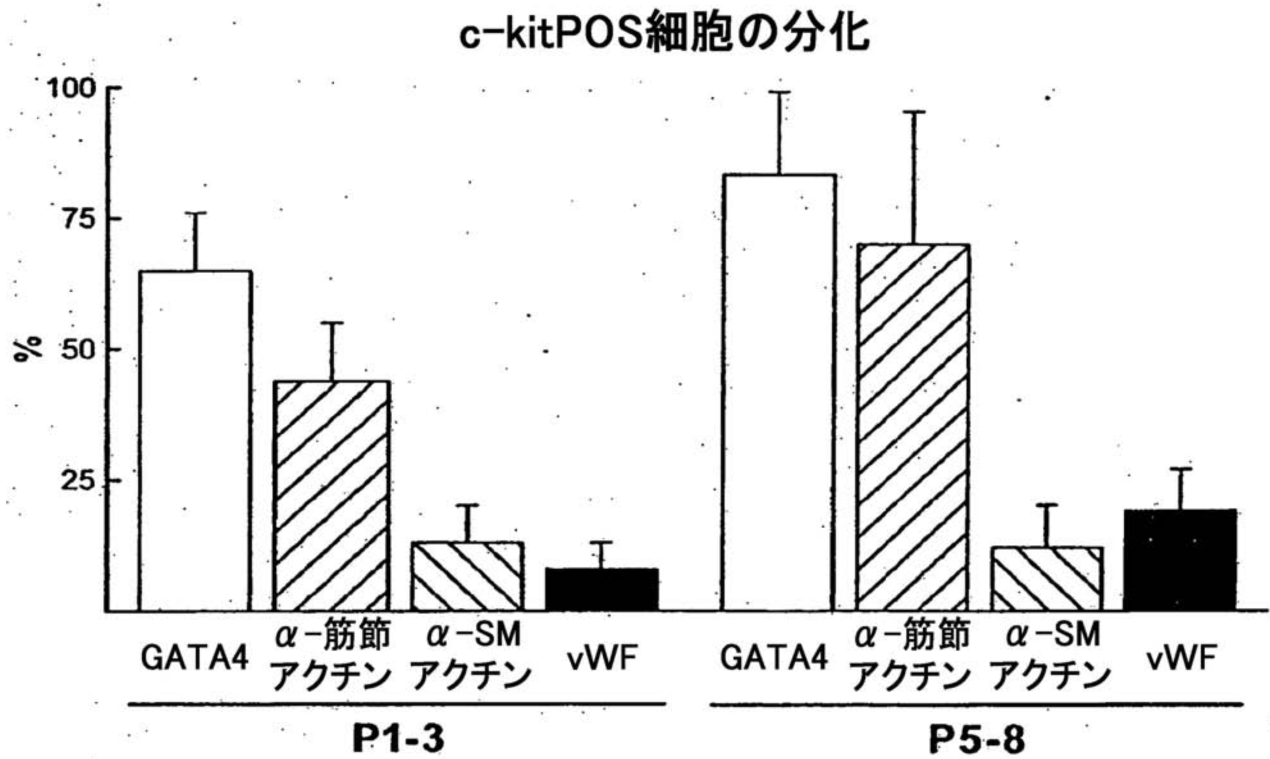
【図７４Ｅ】


E
左心室の解剖分析
マウス
左心室腔容積
160
120
80
40
mm3
SO
MI
MI-hCSCs
左心室質量と腔容積の比
2.10
1.05
mg/mm3
ラット
左心室腔容積
480
240
左心室質量と腔容積の比
6
4
2

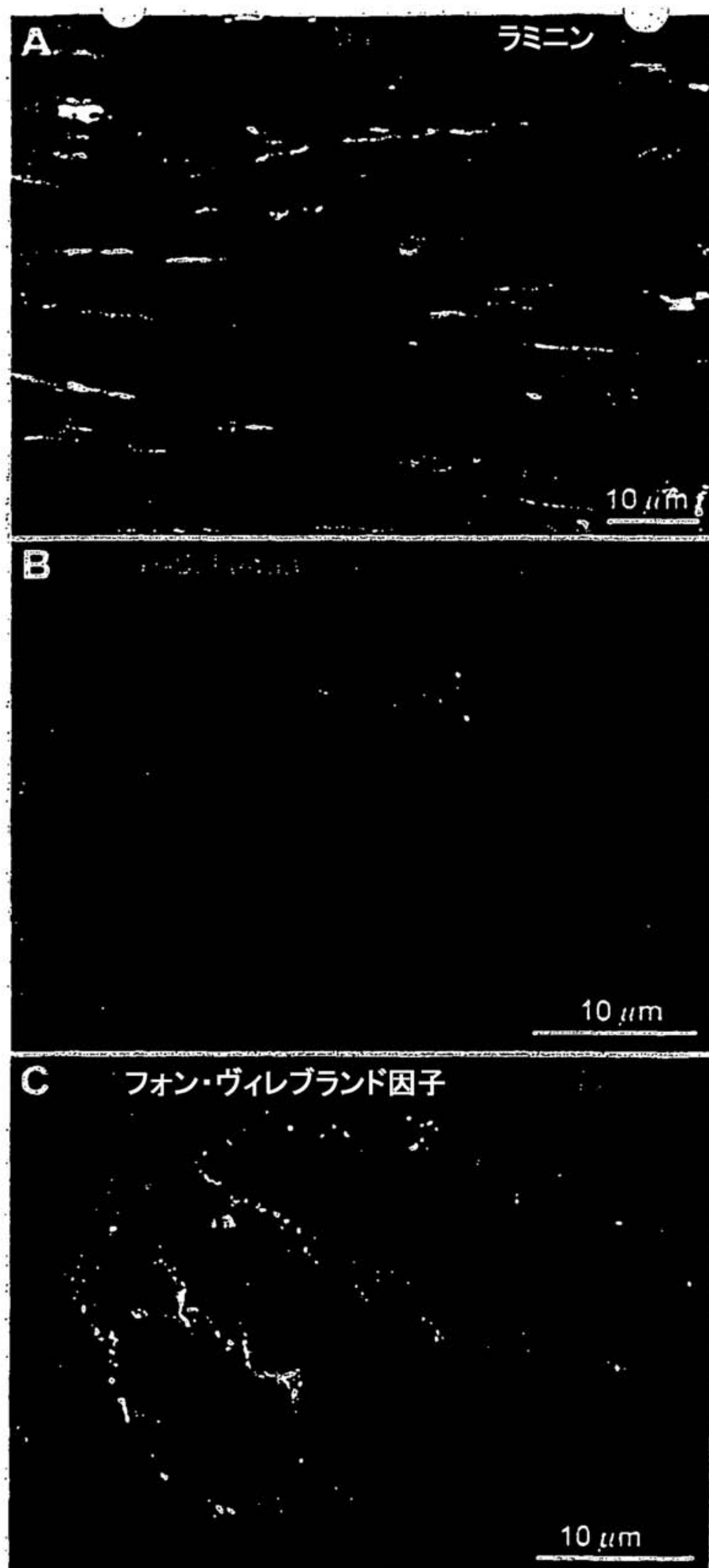
【図７４Ｆ】


F
心室機能
マウス
LVEDP
LVDP
+dP/dt
-dP/dt
mmHg
mmHg/s
SO
MI
MI-hCSCs
ラット

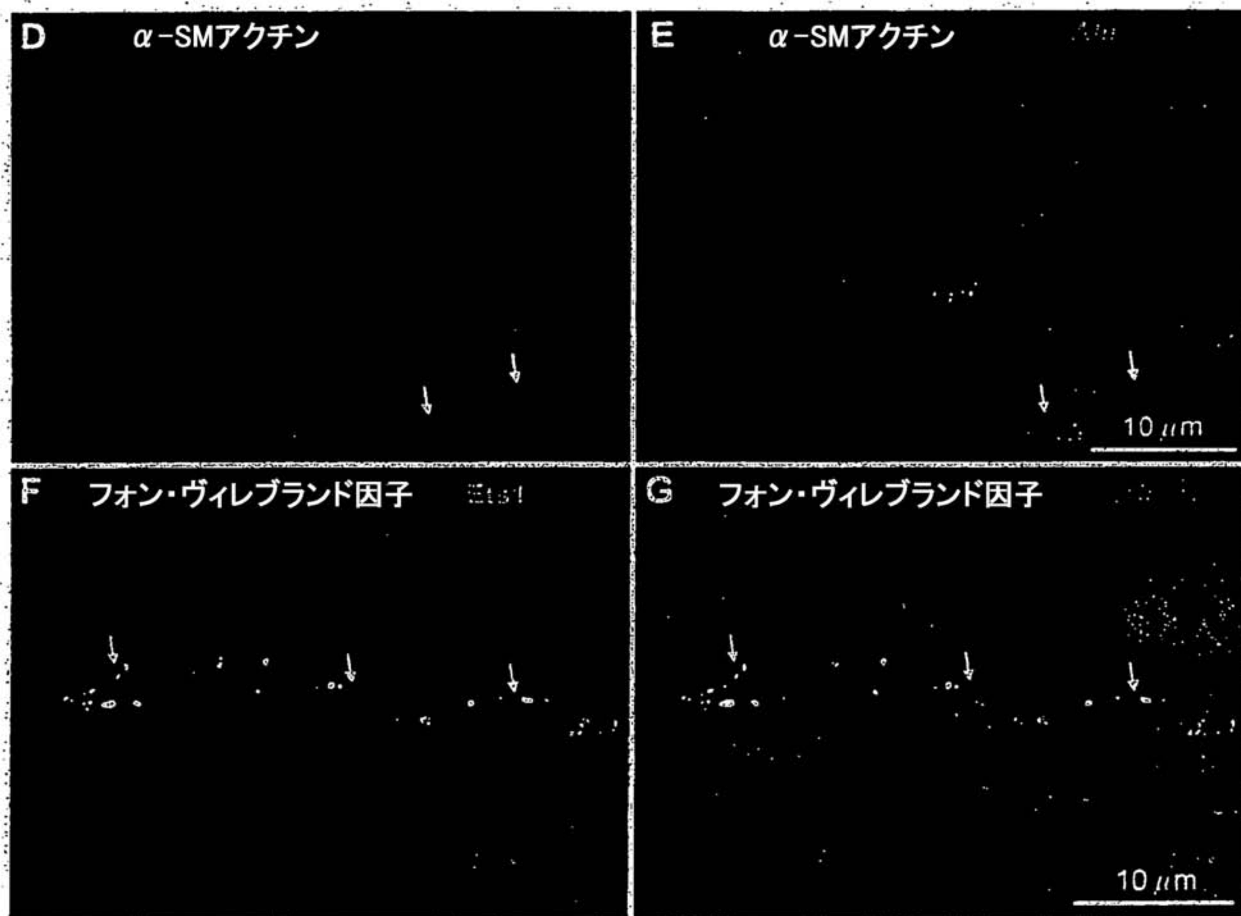
【図７５】


c-kitPOS細胞の分化
100
75
%
50
25
GATA4
α-筋節
アクチン
α-SM
アクチン
vWF
GATA4
α-筋節
アクチン
α-SM
アクチン
vWF
P1-3
P5-8

【図７６Ａ－Ｃ】

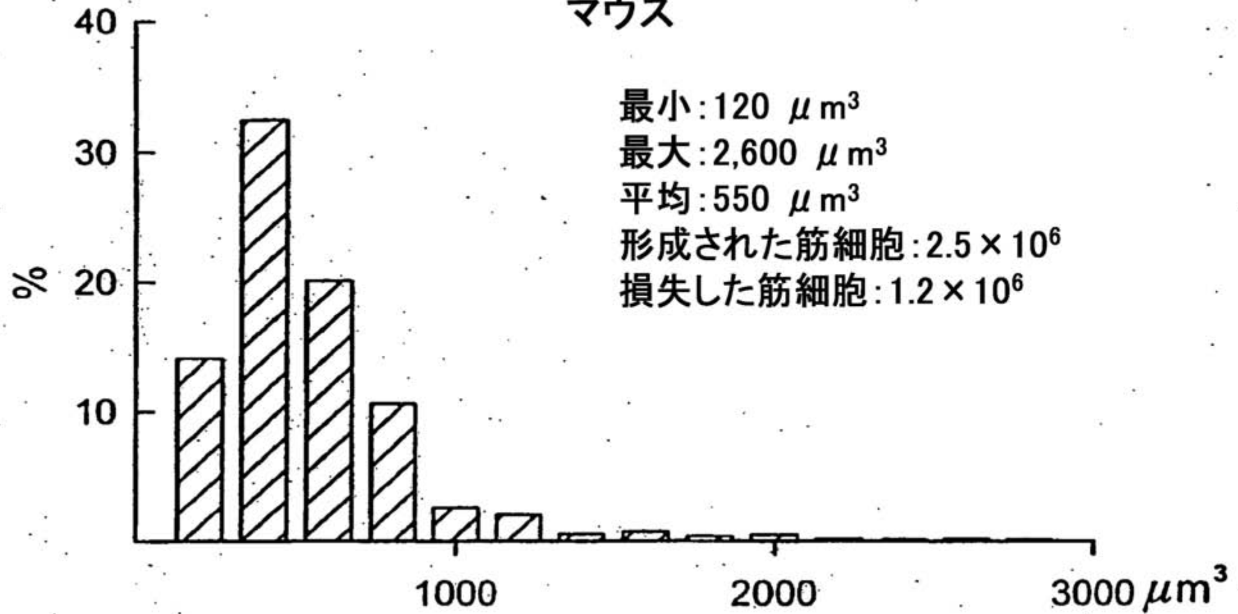


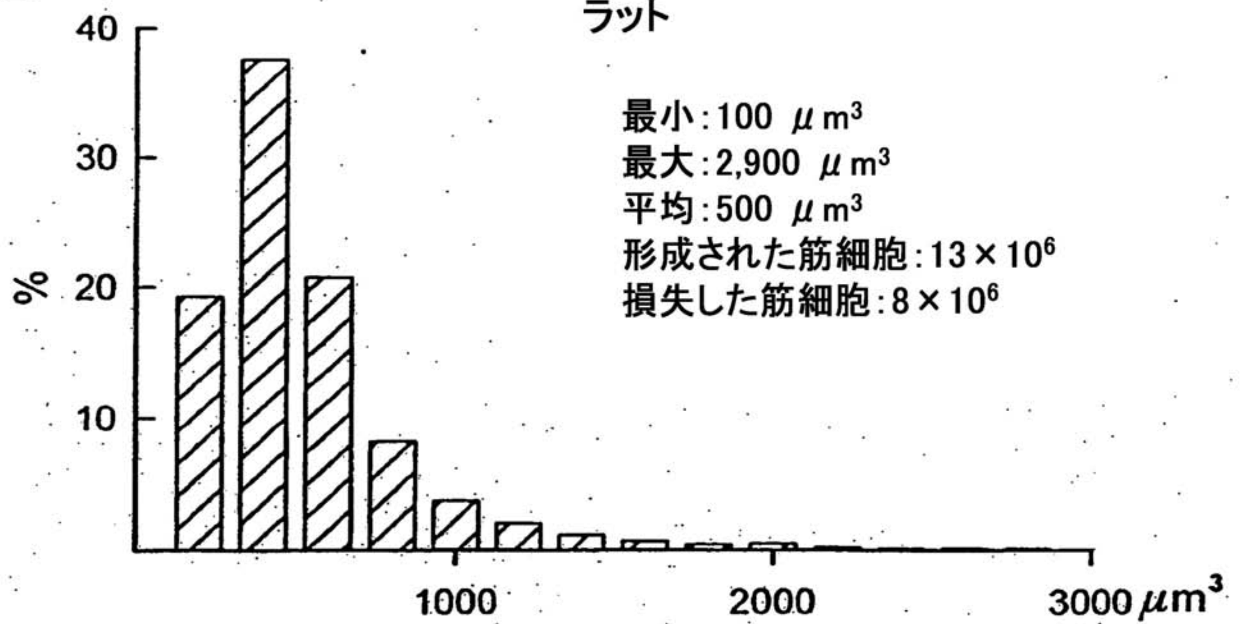
【図７６Ｄ－Ｇ】


D
α-SMアクチン
E
α-SMアクチン
10 μm
F
フォン・ヴィレブランド因子
G
フォン・ヴィレブランド因子
10 μm

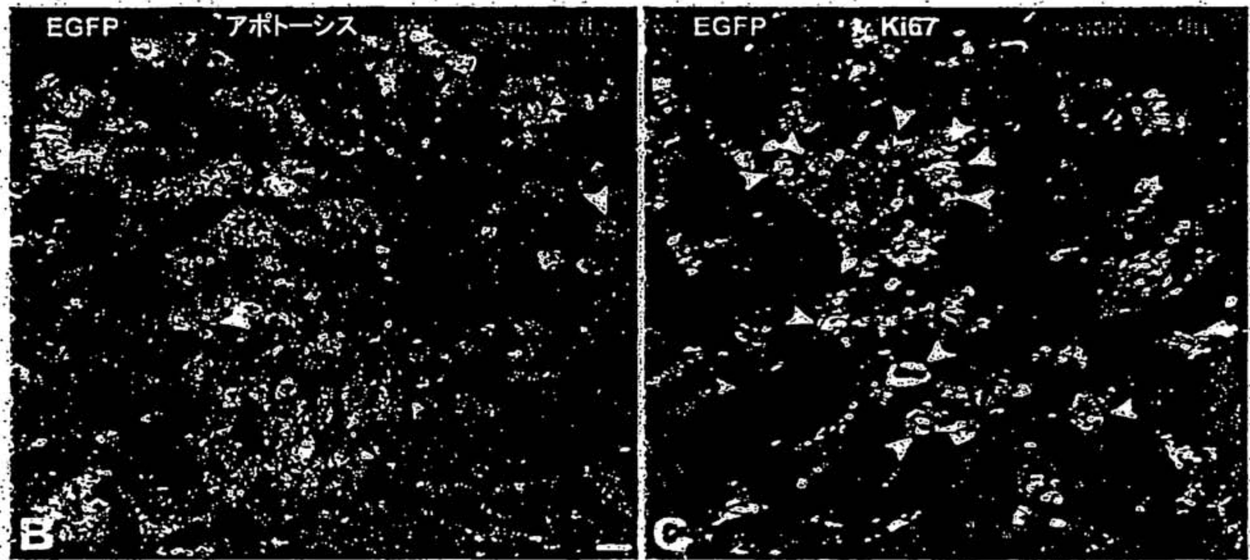
【図７７Ａ－Ｂ】

ヒト筋細胞の容積

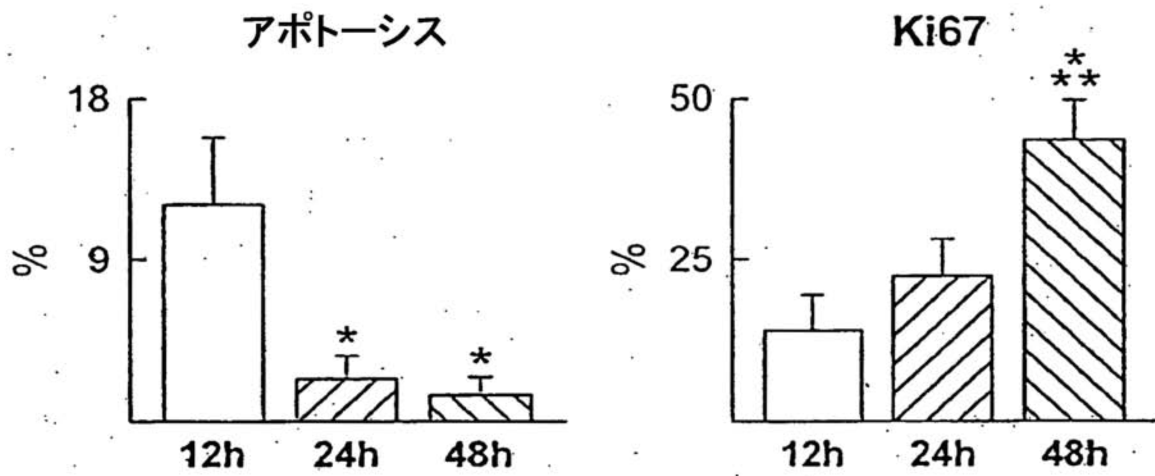




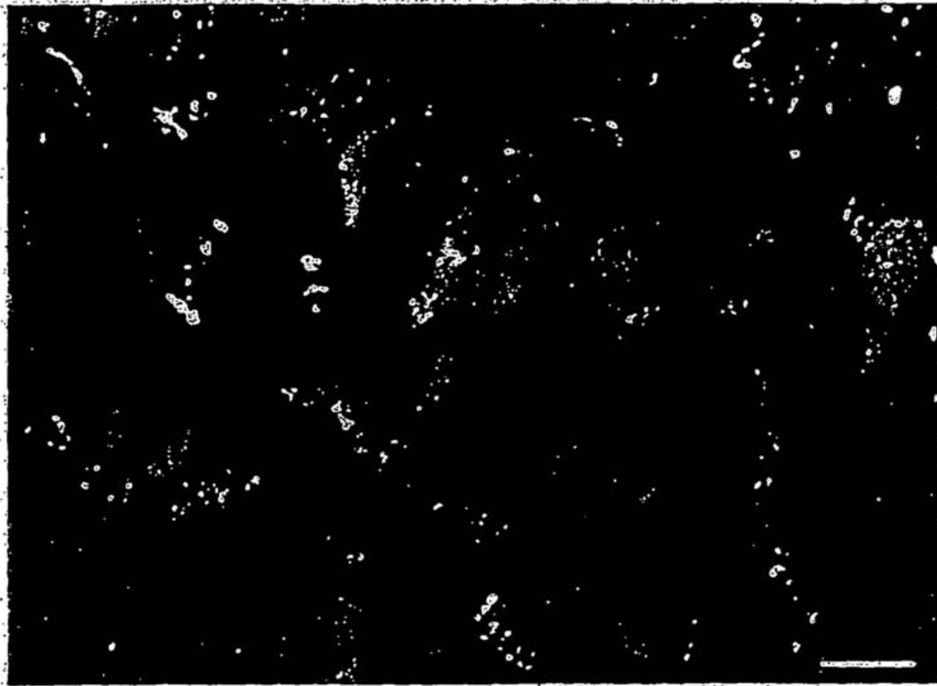
【図７９Ｂ－Ｃ】


EGFP
アポトーシス
B
EGFP
Ki67
C

【図７９Ｄ】

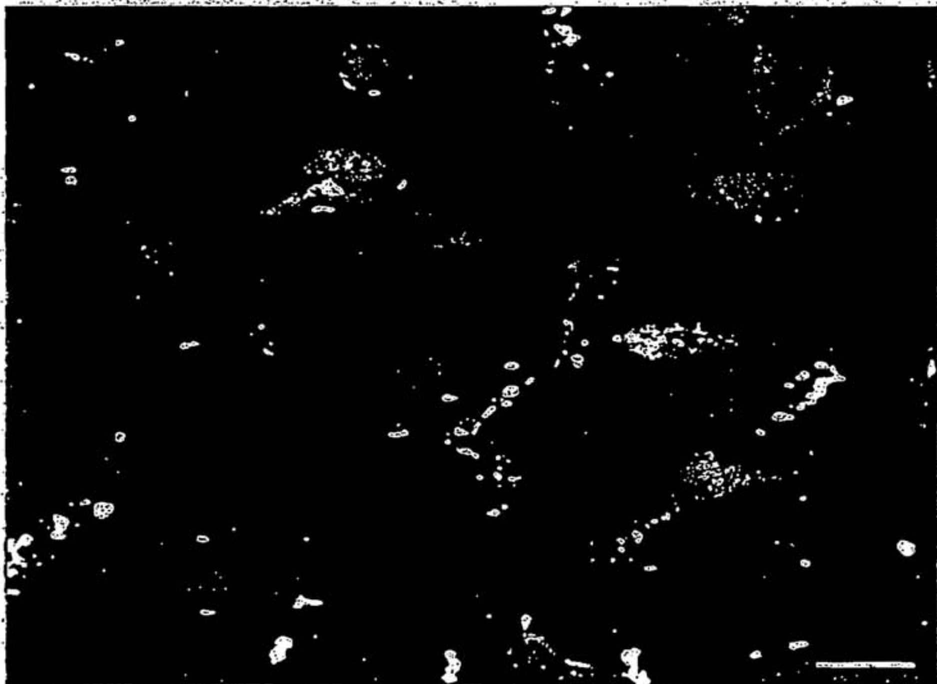

活性化CSC
アポトーシス
18
9
%
*
*
12h
24h
48h
Ki67
50
25
%
**
*
12h
24h
48h

【図７９Ｅ－１】



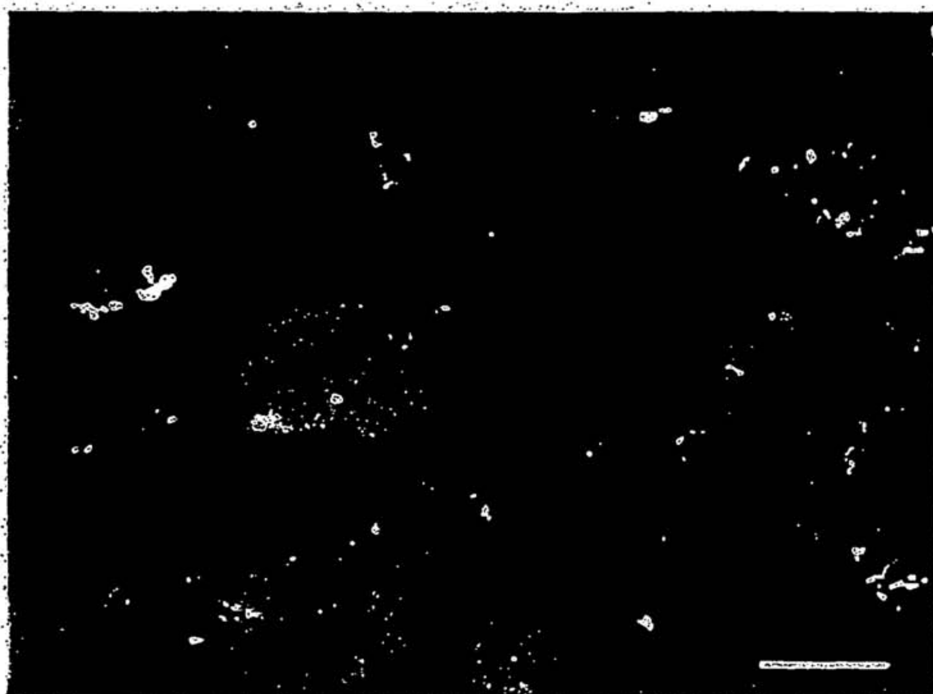
左パネル

【図７９Ｅ－２】



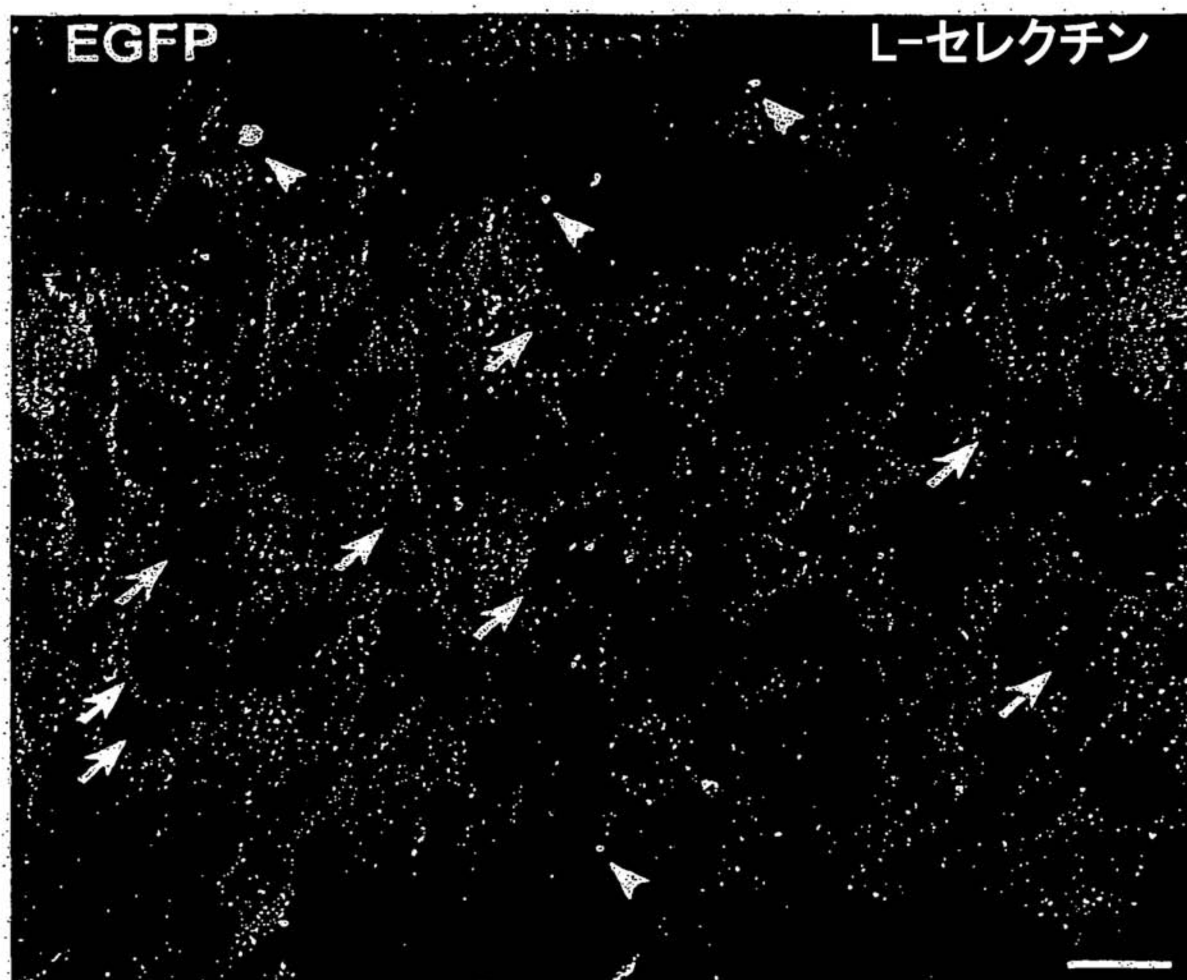
中央パネル

【図７９Ｅ－３】

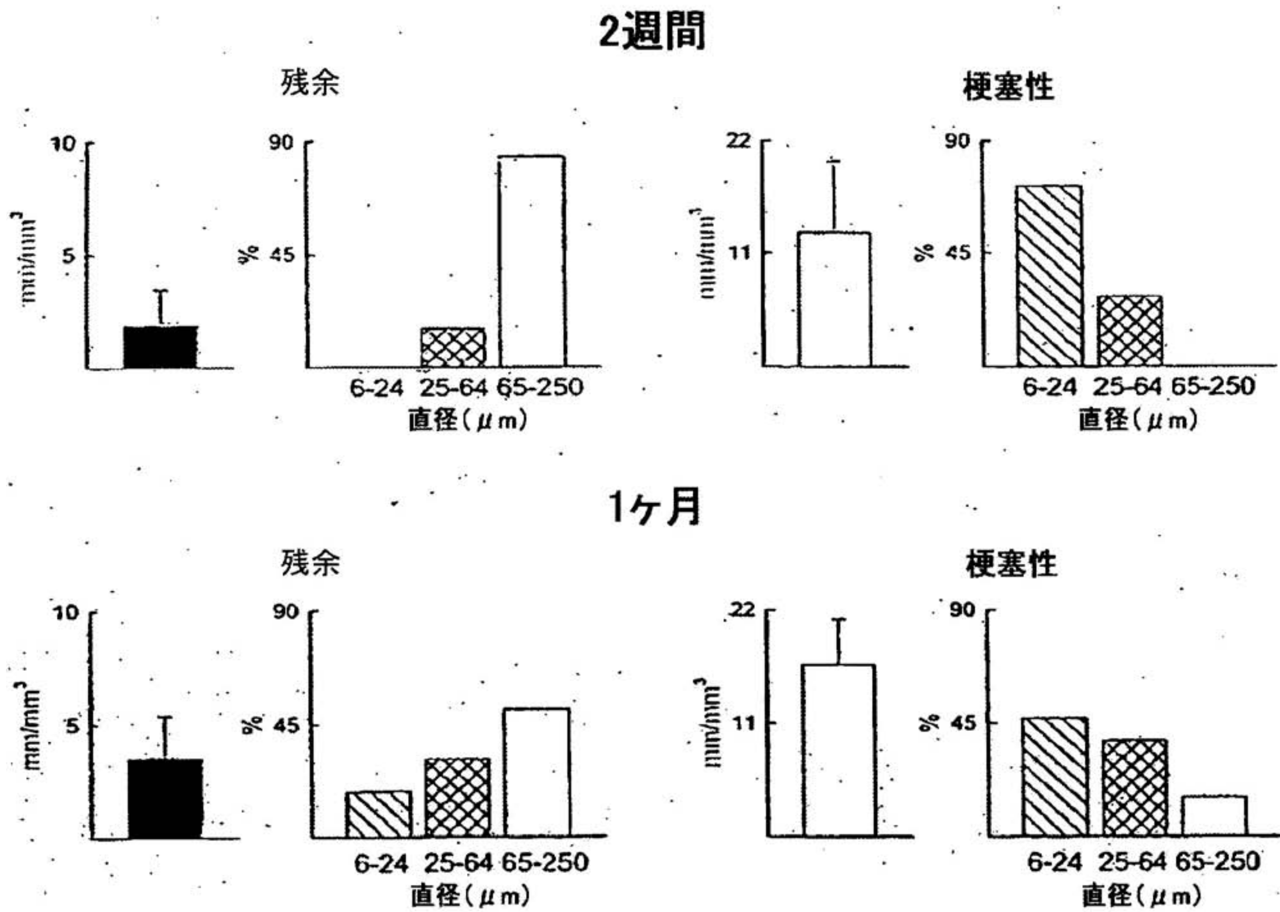


右パネル

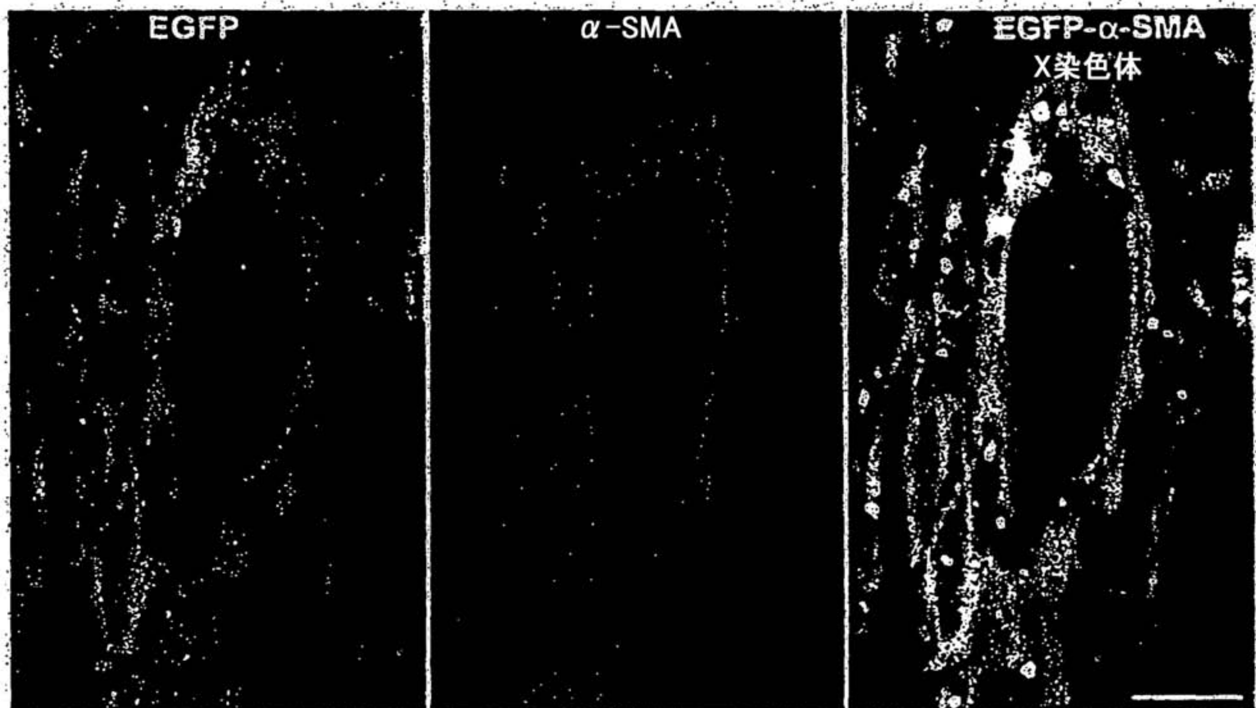
【図７９Ｆ】



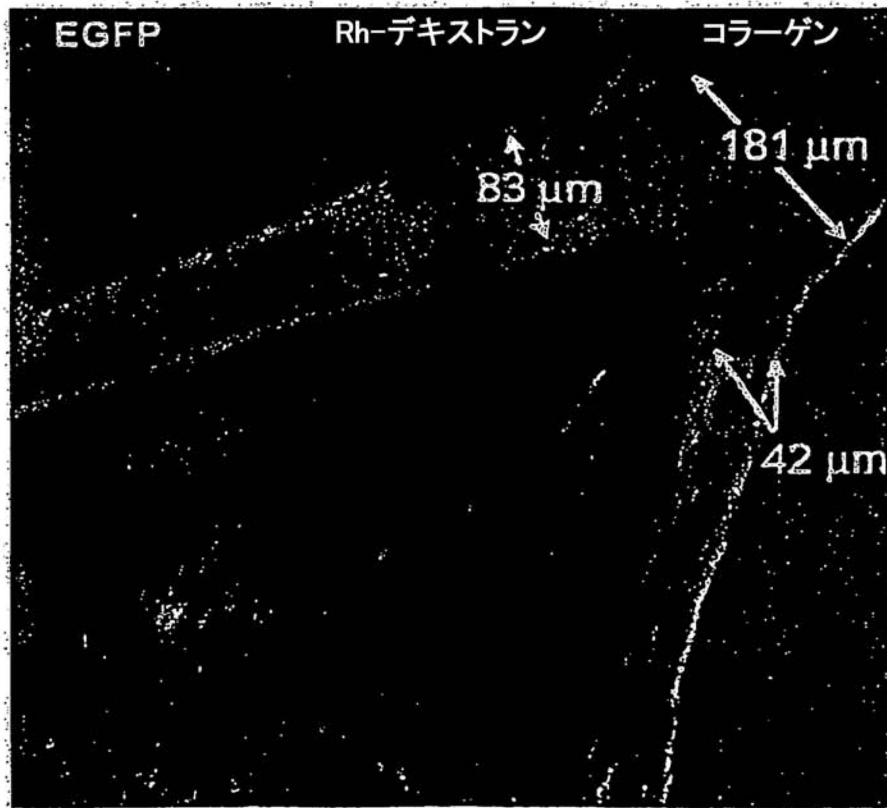
【図８０Ｄ】


2週間
残余
梗塞性
mm/mm3
%
10
5
90
45
22
11
6-24 25-64 65-250
直径（μm）
1ヶ月
残余
梗塞性
mm/mm3
%
10
5
90
45
22
11
6-24 25-64 65-250
直径（μm）

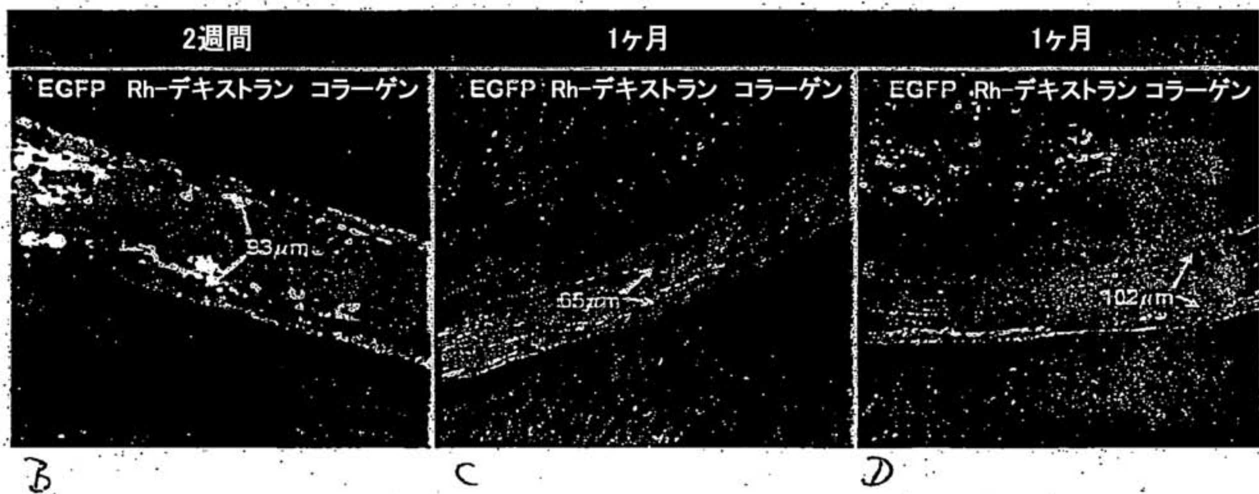
【図８０Ｅ】


EGFP
α-SMA
EGFP-α-SMA
X染色体

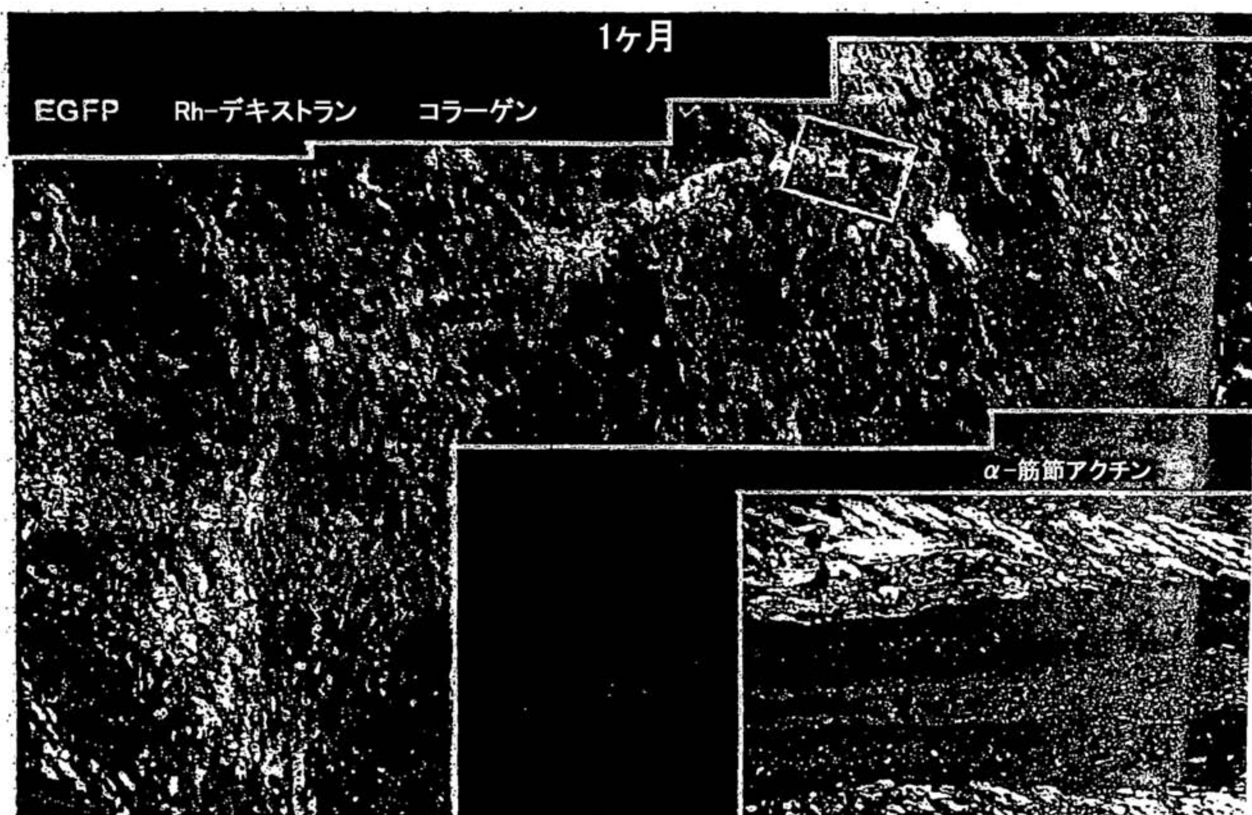
【図８１Ａ】


EGFP
Rh-デキストラン
コラーゲン
83 µm
181 µm
42 µm

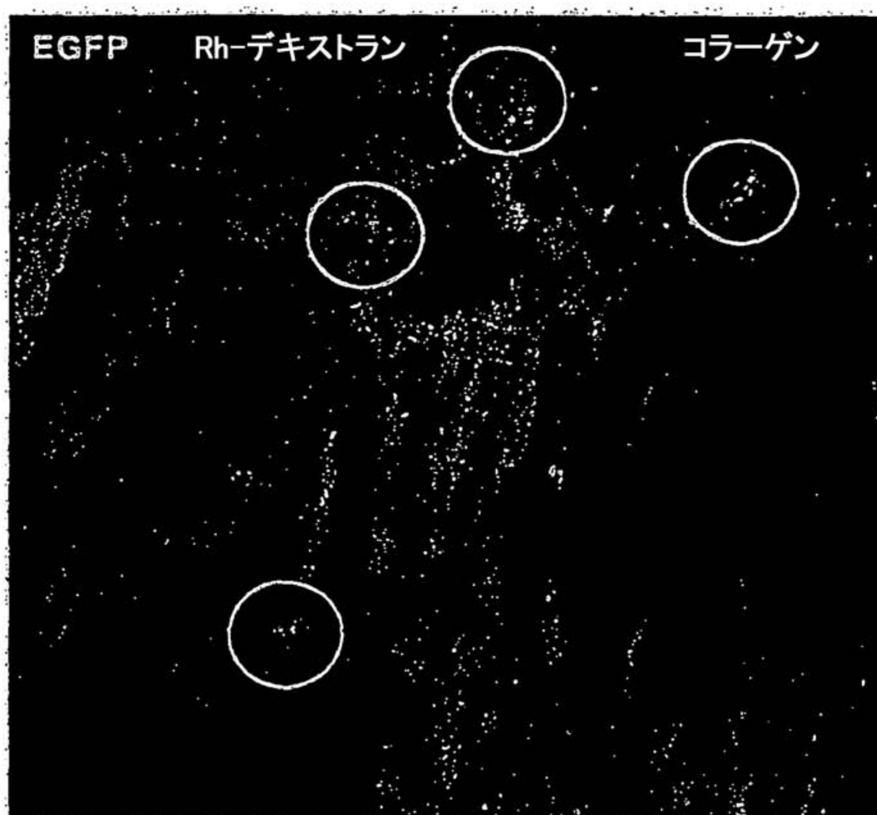
【図８１Ｂ－Ｄ】


2週間
1ケ月
1ケ月
EGFP Rh-デキストラン コラーゲン
EGFP Rh-デキストラン コラーゲン
EGFP Rh-デキストラン コラーゲン
93µm
65µm
102µm
B
C
D

【図８１Ｅ】



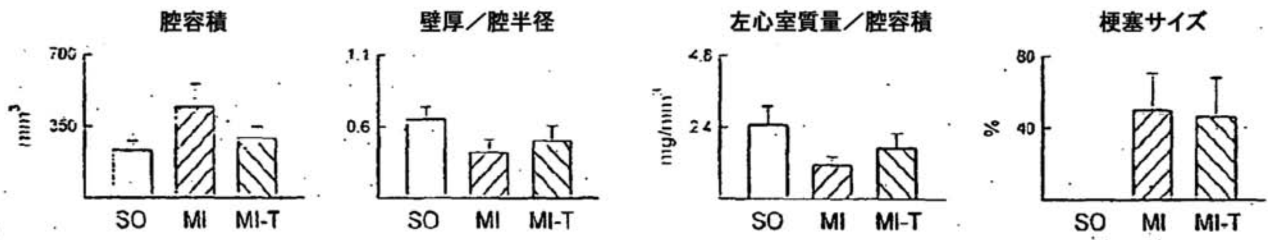
【図８１Ｆ】



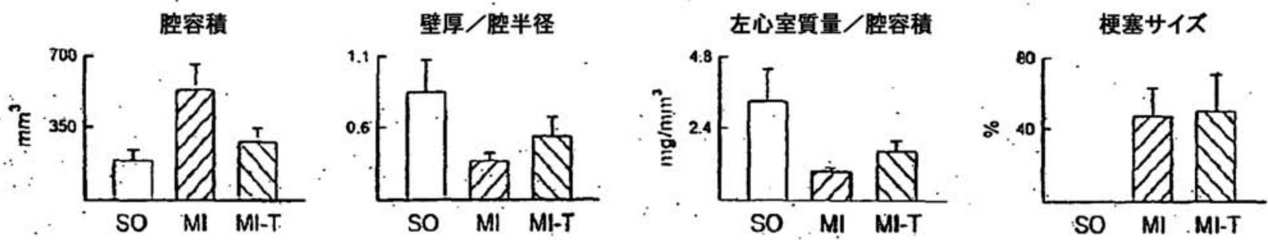
【図８１Ｈ】

心室解剖分析

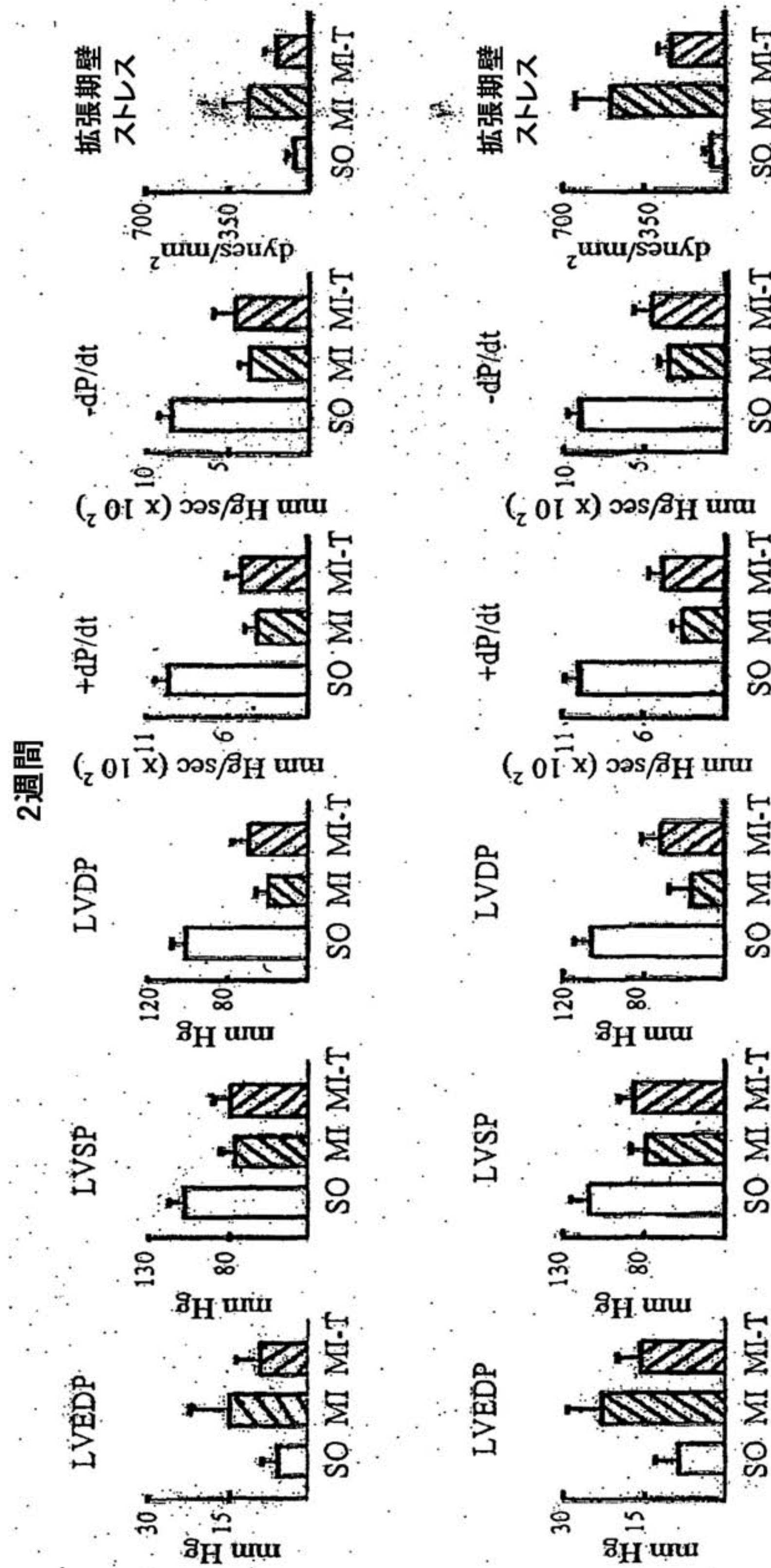
2週間



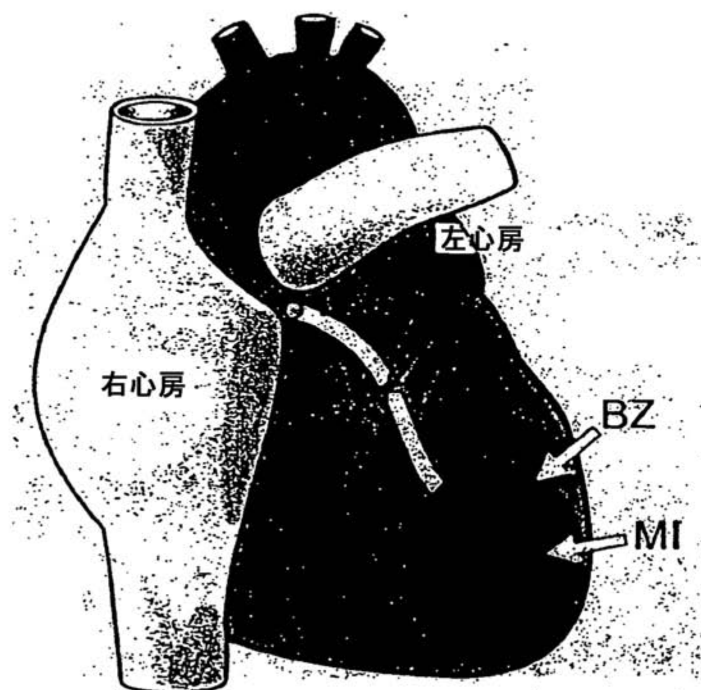
1ヶ月



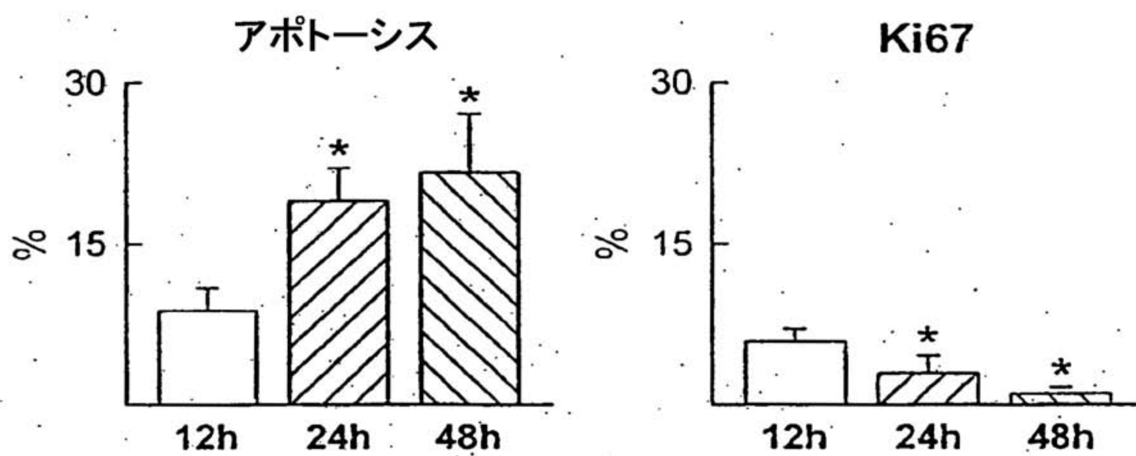
【図８１Ｉ】


2週間
LVEDP
mm Hg
30
15
LVSP
130
80
LVDP
120
80
+dP/dt
mm Hg/sec (x 10 2)
11
6
-dP/dt
10
5
拡張期壁
ストレス
dynes/mm2
700
350
SO MI MI-T

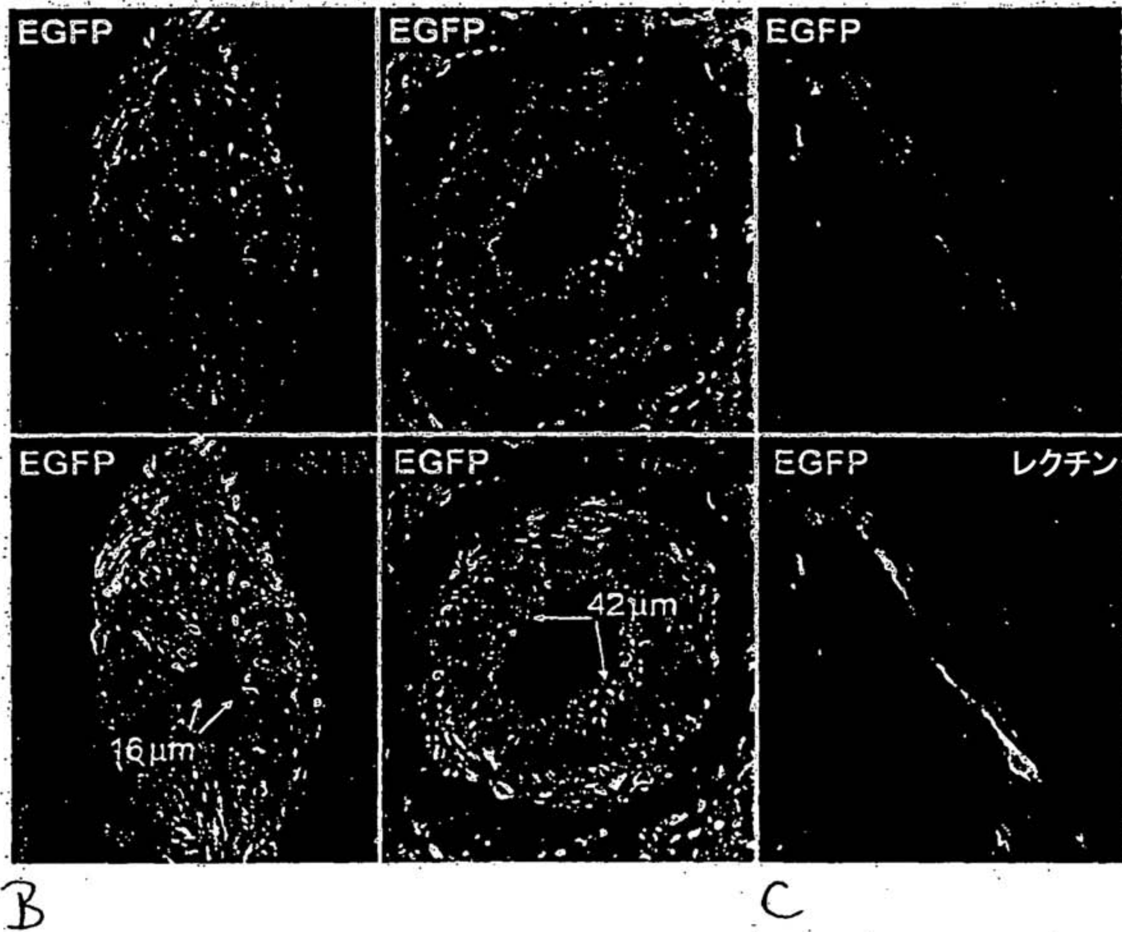
【図８２】



【図８３Ａ－Ｂ】



【図８４Ｂ－Ｃ】



【手続補正書】
【提出日】平成20年10月21日(2008.10.21)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
　損傷心筋の構造的および機能的完全性を、それが必要な患者において、回復する方法であって：患者から心臓幹細胞を抽出すること；前記心臓幹細胞を培養し増殖すること；該抽出され増殖された心臓幹細胞を活性化すること；および前記活性化心臓幹細胞の有効用量を患者の損傷心筋領域へ投与すること；を含み、ここで、該活性化心臓幹細胞が、その投与後に、損傷心筋の構造的及び機能的完全性を回復する方法。
【請求項２】
　患者から心臓幹細胞を抽出することが、患者から心筋組織を採取することおよび前記心筋組織から該心臓幹細胞を単離することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
　抽出され増殖された心臓幹細胞を活性化することが、該抽出され増殖された心臓幹細胞を１種以上のサイトカインに暴露することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
　１種以上のサイトカインが、肝細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子－１およびそれらの組み合わせよりなる群から選択される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】

肝細胞増殖因子が約０～４００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項４に記載の方法。
【請求項６】
インシュリン様増殖因子－１が約０～５００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項４に記載の方法。
【請求項７】
活性化心臓幹細胞が、標識抗体および分類機序を用いて単離される、請求項２に記載の方法。
【請求項８】
活性化心臓幹細胞がｃ－ｋｉｔ陽性である請求項１に記載の方法。
【請求項９】
活性化心臓幹細胞が損傷心筋の境界領域に投与される請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
活性化心臓幹細胞が冠状動脈内投与される請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
活性化心臓幹細胞が、その投与後に、筋細胞、平滑筋細胞および内皮細胞に分化する、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
分化した心臓幹細胞の少なくともいくらかが心筋組織および冠状血管を形成する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
冠状血管が、冠状動脈、冠状細動脈および冠状毛細血管の１つ以上を含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
冠状血管が約６～２５０μｍの範囲の直径を有し、ここで、前記冠状血管が該活性化心臓幹細胞の投与後１ヶ月以内に形成される、請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
冠状血管の少なくとも１つが閉塞動脈または血管のためのバイパスを提供する請求項１２に記載の方法。
【請求項１６】
活性化心臓幹細胞がカテーテル系を介して投与される請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
活性化心臓幹細胞が注射によって投与される請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
活性化心臓幹細胞が冠状動脈内投与される請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
損傷心筋が梗塞である請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
１種以上のサイトカインを患者の心臓に投与することをさらに含む請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
１種以上のサイトカインが、肝細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子－１およびそれらの組み合わせよりなる群から選択される、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
１種以上のサイトカインが活性化心臓幹細胞と同時に投与される請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
損傷心筋の構造的および機能的完全性を、それが必要な患者において、回復する方法であって：患者から単離された心臓幹細胞を受け取ること（ここで、該心臓幹細胞は、培養され増殖され活性化されている）；および前記活性化心臓幹細胞の有効用量を患者の損傷心筋領域へ投与すること；を含み、ここで、該活性化心臓幹細胞は、その投与後に、損傷

心筋の構造的および機能的完全性を回復する方法。

【請求項２４】

心臓幹細胞が患者の心筋組織から単離される請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

心臓幹細胞が１種以上のサイトカインへの暴露により活性化される請求項２３に記載の方法。

【請求項２６】

１種以上のサイトカインが、肝細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子－１およびそれらの組み合わせよりなる群から選択される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

肝細胞増殖因子が約０～４００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】

インシュリン様増殖因子－１が約０～５００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項２６に記載の方法。

【請求項２９】

活性化心臓幹細胞が、標識抗体および分類機序を用いて単離される、請求項２４に記載の方法。

【請求項３０】

活性化心臓幹細胞がｃ－ｋｉｔ陽性である請求項２３に記載の方法。

【請求項３１】

活性化心臓幹細胞が損傷心筋の境界領域に投与される請求項２３に記載の方法。

【請求項３２】

活性化心臓幹細胞が冠状動脈内投与される請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

活性化心臓幹細胞が、その投与後に、筋細胞、平滑筋細胞および内皮細胞に分化する、請求項２３に記載の方法。

【請求項３４】

分化した心臓幹細胞の少なくともいくらかが心筋組織および冠状血管を形成する、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

冠状血管が、冠状動脈、冠状細動脈および冠状毛細血管の１つ以上を含む、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

冠状血管が約６～２５０μｍの範囲の直径を有し、ここで、前記冠状血管が該活性化心臓幹細胞の投与後１ヶ月以内に形成される、請求項３４に記載の方法。

【請求項３７】

冠状血管の少なくとも１つが閉塞動脈または血管のためのバイパスを提供する請求項３４に記載の方法。

【請求項３８】

活性化心臓幹細胞がカテーテル系を介して投与される請求項２３に記載の方法。

【請求項３９】

活性化心臓幹細胞が注射によって投与される請求項２３に記載の方法。

【請求項４０】

活性化心臓幹細胞が冠状動脈内投与される請求項２３に記載の方法。

【請求項４１】

損傷心筋が梗塞である請求項２３に記載の方法。

【請求項４２】

１種以上のサイトカインを患者の心臓に投与することをさらに含む請求項２３に記載の方法。

【請求項４３】

１種以上のサイトカインが、肝細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子－１およびそれらの組み合わせよりなる群から選択される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
１種以上のサイトカインが活性化心臓幹細胞と同時に投与される請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
生物学的冠状バイパスを、それが必要な患者において、形成する方法であって：患者から心臓幹細胞を抽出すること；前記心臓幹細胞を培養しおよび増殖すること；該抽出され増殖された心臓幹細胞を活性化すること；および前記活性化心臓幹細胞の有効用量を、患者において冠状血管が閉塞した部位に投与すること；を含み、ここで、該活性化心臓幹細胞が、その投与後に、伝導性冠状動脈を形成することにより生物学的冠状バイパスを形成する、前記の方法。
【請求項４６】
患者から心臓幹細胞を抽出することが、患者から心筋組織を採取することおよび前記心筋組織から該心臓幹細胞を単離することを含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
抽出され増殖された心臓幹細胞を活性化することが、該抽出され増殖された心臓幹細胞を１種以上のサイトカインに暴露することを含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
１種以上のサイトカインが、肝細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子－１およびそれらの組み合わせよりなる群から選択される、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
肝細胞増殖因子が約０～４００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
インシュリン様増殖因子－１が約０～５００ｎｇ／ｍＬの量で存在する請求項４８に記載の方法。
【請求項５１】
活性化心臓幹細胞が、標識抗体および分類機序を用いて単離される、請求項４６に記載の方法。
【請求項５２】
伝導性冠状血管が少なくとも１５０μｍの直径を有する請求項４５に記載の方法。
【請求項５３】
伝導性冠状血管が、活性化心臓幹細胞の分化によって生産された平滑筋細胞および内皮細胞を含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項５４】
１種以上のサイトカインを、冠状血管が閉塞した部位に投与することをさらに含む請求項４５に記載の方法。
【請求項５５】
１種以上のサイトカインが、肝細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子－１およびそれらの組み合わせよりなる群から選択される、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
１種以上のサイトカインが活性化心臓幹細胞と同時に投与される請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
ＤＭＥＭ／Ｆ１２、５～２０％の患者血清、約１０～１００ｎｇ／ｍＬのヒト組換えｂＦＧＦ、約１０～１００ｎｇ／ｍＬのヒト組換えＥＧＦ、約２～２０μｇ／ｍＬのインシュリン、約２～２０μｇ／ｍＬのトランスフェリン、約２～１０ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウム、約０．２４～２．４４ｍｇ／ｍＬのウリジンおよび約０．２７～２．６８ｍｇ／ｍＬのイノシンを含む、ヒト心臓幹細胞増殖用成長培地。
【請求項５８】

損傷心筋の構造的および機能的完全性を、それが必要な患者において、回復するバイオテクノロジープロセスであって：患者から心臓幹細胞を抽出すること；前記心臓幹細胞を培養し増殖すること；該記抽出され増殖された心臓幹細胞を活性化すること；および前記活性化心臓幹細胞の有効用量を患者の損傷心筋領域へ投与すること；を含み、ここで、該活性化心臓幹細胞が、その投与後に、損傷心筋の構造的および機能的完全性を回復するプロセス。

【請求項５９】

生物学的冠状バイパスを、それが必要な患者において、形成するバイオテクノロジープロセスであって：患者から心臓幹細胞を抽出すること；前記心臓幹細胞を培養し増殖すること；該記抽出され増殖された心臓幹細胞を活性化すること；および前記活性化心臓幹細胞の有効用量を、患者において冠状血管が閉塞した部位に投与すること；を含み、ここで、該活性化心臓幹細胞が、その投与後に、伝導性冠状動脈を形成することにより生物学的冠状バイパスを形成するプロセス。

【請求項６０】

単離され精製され増殖された心臓幹細胞および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項６１】

心臓幹細胞がｃ－ｋｉｔ陽性である請求項６０に記載の医薬組成物。

【請求項６２】

１種以上のサイトカインをさらに含む請求項６０に記載の医薬組成物。

【請求項６３】

１種以上のサイトカインが、肝細胞増殖因子および／またはインシュリン様増殖因子－１である請求項６２に記載の医薬組成物。

【請求項６４】

損傷心筋の構造的および機能的完全性を、それが必要な患者において、回復するための医薬組成物であって：患者から採取された、培養され増殖された心臓幹細胞を含み、ここで、前記組成物の投与後に構造的および機能的完全性が回復する組成物。

【請求項６５】

損傷心筋の構造的および機能的完全性を、それが必要な患者において、回復する方法であって：ヒトから心筋組織を採取すること；前記心筋組織から心臓幹細胞を単離すること；該単離された心臓幹細胞を培養し増殖すること；該単離され増殖された心臓幹細胞を１種以上のサイトカインに暴露することにより活性化心臓幹細胞を生産すること；および前記活性化心臓幹細胞の有効用量を患者の損傷心筋領域へ投与すること；を含み、ここで、該活性化心臓幹細胞が、その投与後に、損傷心筋の構造的および機能的完全性を回復する方法。

【請求項６６】

心臓幹細胞が自系である請求項６５に記載の方法。

【請求項６７】

生物学的冠状バイパスを、それが必要な患者において、形成する方法であって：ヒトから心筋組織を採取すること；前記心筋組織から心臓幹細胞を単離すること；該単離された心臓幹細胞を培養し増殖すること；該単離され増殖された心臓幹細胞を１種以上のサイトカインに暴露することにより活性化心臓幹細胞を生産すること；および前記活性化心臓幹細胞の有効用量を患者において冠状血管が閉塞した部位に投与すること；を含み、ここで、該活性化心臓幹細胞が、その投与後に、伝導性冠状動脈を形成することにより生物学的冠状バイパスを形成する方法。

【請求項６８】

心臓幹細胞が自系である請求項６７に記載の方法。

【国際調査報告】



60800760013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 07/04287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 5/08 (2008.04)
USPC - 435/366
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC - 435/366

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 435/325, 384, 387, 389, 405, 406 (text search, see terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google/Scholar; PubMed (text search, see terms below)
Search terms: Cardiac stem cell, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, cardiomyocyte, somatic, EGF, FGF, vessel, artery, formation, regeneration, patient serum media, transferring, insulin, selenite, uridine, inosine.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2003/0054973 A1 (ANVERSA) 20 March 2003 (20.03.2003); Claim 33, Claim 36, paras [0003], [0005], [0006], [0045], [0046], [0049], [0069], [0152], [0184], [0197]-[0199], [0274], [0276], [0307].	1-11, 13, 22, 23 12, 14-21, 24-27
Y	US 2003/0105015 A1 (GILBERTSON et al.) 5 June 2003 (05.06.2003); para [0053].	12, 14-21, 24-27
Y	Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement, Datasheet [Online]. Roche Diagnostics. 2005 [retrieved on Sept. 7, 2008]. Retrieved from the Internet:<URL: http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1074547a.pdf>.	14-16, 19, 20, 26, 27
Y	Saitou et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. Journal of Cell Biology, 1998, vol 141, pp 397-408; (page 398, para 6).	16, 20, 27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 September 2008 (08.09.2008)	15 SEP 2008

Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

26.12.2008

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ｃ１２Ｎ 5/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
		Ｃ１２Ｎ	5/00	Ｅ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アンベルサ，ピエロ
アメリカ合衆国，ニューヨーク州 １００２１，ニューヨーク，イースト ７９番 ストリート ２２９，アパートメント １４ディー

Ｆターム(参考) 4B065 AA93X BB34 CA44
4C087 AA01 AA02 AA04 BB47 BB64 CA04 NA14 ZA36 ZA42 ZA45
ZB11 ZB15 ZB21